

**Vergleichende Untersuchungen zur Sekretion und
Resorption schwacher organischer Säuren im Jejunum und
Colon von Meerschweinchen und Mensch**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften der Abteilung für
Biologie der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Günter Sprakties
aus Gelsenkirchen

Bochum 1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546604_0016

1.Referent : Prof. Dr. F. Lauterbach
2.Referent : Prof. Dr. H. Ch. Lüttgau

Disputation : 4.Sept.1987

**Vergleichende Untersuchungen zur
Sekretion und Resorption schwacher
organischer Säuren im Jejunum und
Colon von Meerschweinchen und Mensch**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften der Abteilung für
Biologie der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Günter Sprakties
aus Gelsenkirchen

Bochum 1987

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ruhr-Universität Bochum, Institutsdirektor Prof. Dr. B.A. Peskar in der Arbeitsgruppe für Biochemische Pharmakologie unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. F. Lauterbach

im Zeitraum zwischen November 1984 und Mai 1987 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. F. Lauterbach danke ich herzlich für die wissenschaftliche Anleitung sowie die Betreuung und Förderung dieser Arbeit. Bei Herrn Prof. Dr. H.Ch. Lüttgau möchte ich mich für die Übernahme des Koreferates bedanken.

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	8
2.1.	Chemikalien	8
2.1.1.	Radioaktiv markierte Verbindungen	8
2.1.2.	Synthese von N-Acetyl-p-aminobenzoesäure (Ac-PABA)	9
2.1.3.	Unmarkierte Verbindungen	10
2.2.	Lösungen	12
2.2.1.	Versuchspuffer	12
2.2.1.1	Krebs-Tris Puffer pH 7,0	12
2.2.1.2	Krebs-Hepes und Krebs-Bistris Puffer	13
2.2.1.3	Tris-Puffermedien, Cl ⁻ -frei, pH 7,00	13
2.2.1.4	Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,4	14
2.2.2.	Inkubationslösungen	14
2.3.	Tiermaterial	17
2.4.	Präparation der isolierten Mukosa	17
2.4.1.	Meerschweinchenmukosa	17
2.4.2.	Humanmukosa	18
2.5.	Kammermethodik und Inkubationsverlauf	19
2.5.1.	Regelfall	19
2.5.2.	Versuche mit einer Vorinkubation des Gewebes	21
2.5.3.	Effluxversuche	22
2.5.4.	Influxversuche	23
2.6.	Probenaufbereitung	24
2.7.	Bestimmungsmethoden	25
2.7.1.	Szintillationszählung	25
2.7.2.	Dünnschichtchromatographische Methoden	25
2.7.3.	HPLC-Methodik	27
2.7.4.	Kolorimetrische Bestimmung von PABA	28
2.7.5.	Bestimmung des pH-Wertes der Inkubationslösungen	31
2.8.	Bestimmung der Verteilungskoeffizienten	31
2.9.	In vivo Perfusionstechnik	32
2.10.	Berechnungen und Statistik	34
2.10.1.	Berechnungen zur Methode der isolierten Mukosa	34
2.10.2.	"Passive" Parameter der Methode der isolierten Mukosa	38
2.10.3.	Statistische Methoden	39
3.	Untersuchungen zur Metabolisierung aromatischer Amine	41
3.1.	Metabolismus und Metabolitenabgabe der p-Aminobenzoesäure	41
3.1.1.	Identifikation der Metaboliten	41
3.1.2.	Gesamtmetabolisierung bei steigender Angebotskonzentration	43
3.1.3.	Verteilung von Substrat und Metabolit am Jejunum des Meerschweinchens	44
3.1.3.1	Konzentrationsabhängigkeit	44
3.1.3.2	Versuche zur Schädigung des lumenseitigen Metabolisierungsraumes	46

3.1.4.	Verteilung von Substrat und Metabolit am Colon des Meer- schweinchens	53
3.1.4.1	Konzentrationsabhängigkeit	
3.1.4.2	Metabolisierung und Metabolitenabgabe am Colon unter Ein- fluß von Phenoxybenzamin	55
3.1.5.	Verteilung von Substrat und Metabolit an humanen Mukosa- präparaten	59
3.1.5.1	Versuche am Dünndarm	59
3.1.5.2	Versuche am Dickdarm	61
3.2.	Metabolismus und Metabolitenabgabe des p-Acetaminophenons	63
3.2.1.	Identifikation der Metaboliten	63
3.2.2.1	Verteilung von Substrat und Metabolit am Jejunum des Meer- schweinchens	63
3.2.2.2	Versuche zur Schädigung des lumenseitigen Metabolisierungs- raumes	66
3.2.3.	Verteilung von Substrat und Metabolit am Colon des Meer- schweinchens	68
3.3.	in vivo Perfusion	69
3.3.1.	Versuche am Meerschweinchen-Jejunum	69
3.3.2.	Versuche am Meerschweinchen-Colon	71
3.3.3.	Versuche am Ratten-Colon	74
4.	Diskussion der Metabolisierungsstudien	76
4.1.	Metabolisierung von PABA und AAP am Jejunum und Colon	76
4.1.1.	N-Acetylierung des PABA	76
4.1.2.	Anteil der Glycin-Konjugation am Metabolismus von PABA	78
4.1.3.	weitere Metaboliten des PABA	79
4.1.4.	N-Acetylierung des Aminoacetophenons	80
4.2.	Verteilung der Metaboliten von PABA und AAP am Jejunum	81
4.2.1.	Verteilung zur lumen- und blutseitigen Inkubationslösung	81
4.2.2.	Verteilung anderer Metabolite an der isolierten Mukosa	81
4.2.3.	Verteilung von Ac-PABA in situ	84
4.2.4.	Mechanismus der von der Angebotsseite abhängigen Verteilung von Metabolisierungsprodukten	85
4.2.5	Untersuchungen zum räumlichen Korrelat des lumenseitigen Metabolisierungsraumes	87
4.2.6.	Stimulation der Konjugation von PABA durch EDTA und Cellobiose	90
4.3.	Verteilung der Metaboliten von PABA und AAP am Colon	92
4.3.1.	Verteilung zur lumen- und blutseitigen Inkubationslösung	92
4.3.2.	Mechanismus der von der Angebotsseite abhängigen Verteilung von Ac-PABA	92
4.3.3.	Verteilung anderer Konjugate	95
4.3.4.	in situ Korrelation der in vitro Ergebnisse	96
4.3.5.	Hemmung des Transportes von Ac-PABA in der contraluminalen Membran	97
5.	Ergebnisteil der Untersuchungen zum Permeationsmechanismus von PABA am Jejunum	98
5.1.	Aerobe Inkubation bei 37°C	98
5.1.1.	Feuchtgewicht, ER und shunt-Permeabilität	98
5.1.2.	Konzentrationsabhängigkeit der Permeation von PABA	100

- III -

5.2.	Anaerobe Inkubation bei 37°C	103
5.3.	Aerobe Inkubation bei 7°C	106
5.4.	Einfluß des pH-Wertes des Inkubationsmediums	108
5.4.1.	Feuchtgewicht, ER und shunt-Permeabilität	108
5.4.2.	Permeation und Gewebsgehalte von PABA	110
5.5.	Einfluß lumenseitiger hyperosmolarer Vorinkubation	113
5.6.	Versuche zur Inhibition der Netto-Sekretion über blut-seitig gegebenes Phenoxybenzamin	115
5.6.1.	PBA und PABA	117
5.6.2.	PBA und β -Naphtholorange	118
5.7.	Efflux von PABA	119
5.8.	Permeation und Gewebsgehalt von N-Acetyl-PABA als Substrat	122
6.	Diskussion der Permeationsmechanismen am Jejunum	125
6.1.	Passive Parameter und Homogenität der Methode der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums	125
6.2.	Permeation von PABA und Ac-PABA	127
6.2.1.	Netto-Sekretion und Gewebsgehalt	127
6.2.2.	Stoffwechselabhängigkeit der Netto-Sekretion	129
6.2.3.	Inkubationstemperatur und Netto-Transport	130
6.2.4.	Änderungen im pH-Wert der Inkubate	131
6.2.5.	Ionencarrier als Ursache des lokalen Mikroklimas	134
6.2.6.	Vermittelter Transport von PABA	136
6.2.7.	pH-Wert des Mediums und Transportrate	137
6.3.	Transport von Carbonsäuren und β -Naphtholorange	140
7.	Ergebnisteil der Untersuchungen zum Permeationsmechanismus aromatischer Säuren am Colon	141
7.1.	Feuchtgewicht, ER und shunt-Permeabilität	141
7.2.	Untersuchungen zum Permeationsmechanismus von PABA	144
7.2.1.	Konzentrationsabhängigkeit	144
7.2.2.	pH-Wert Änderungen der Inkubationsmedien während der Inkubation	148
7.2.3.	Verteilung von PABA nach beidseitigem Angebot	151
7.2.4.	Inkubation bei 7°C	153
7.2.5.	Einfluß des pH-Wertes des Inkubationsmediums	156
7.2.6.	Inkubation unter Einfluß von Phenoxybenzamin	160
7.2.7.	K ⁺ -freie Inkubation	163
7.2.8.	Cl ⁻ -freie Inkubation	164
7.2.9.	Inkubation unter Einfluß von Acetazolamid	168
7.2.10.	Inkubation unter Einfluß von Ouabain	170
7.2.11.	Inkubation unter Einfluß von SITS	172
7.2.12.	Inkubation unter Einfluß von Amilorid und Omeprazol	174
7.2.13.	Inkubation unter Einfluß der Salicylsäure	176
7.3.	Versuche zum In- und Efflux von PABA	178
7.3.1.	Methodische Vorversuche: Zeitabhängigkeit der Aufnahme	178

7.3.2.	Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme von PABA	182
7.3.3.	Hemmung der Aufnahme von PABA	184
7.3.4.	Efflux von PABA	186
7.4.	Vergleichende Untersuchung zur Permeation anderer Säuren am Meerschweinchen-Colon	188
7.4.1.	Permeation des Ac-PABA	188
7.4.2.	Permeation der Salicylsäure	190
7.4.3.	Permeation der Sulfanilsäure	193
7.4.4.	β -Naphtholorange	195
7.4.4.1	Parallele Sekretion von β -Naphtholorange und Resorption von PABA	195
7.4.4.2	Hemmung der Sekretion von β -Naphtholorange mit Phenoxybenzamin	197
8.	Diskussion der Permeationsmechanismen organischer Säuren am Colon	200
8.1.	Passive Parameter und Homogenität der Methode der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Colons	200
8.2.	Permeationsmechanismus von PABA und H^+ -Sekretion am Colon	202
8.3.1.	H^+ -Sekretion des Colons	203
8.3.2.	Abhängigkeit vom Metabolismus	203
8.3.3.	Protonencarrier als molekulare Basis der Ansäuerung	204
8.3.4.	Einfluß des Herzglykosides Oubain auf die Ansäuerung	206
8.3.5.	Hemmung des H^+ -Carriers durch Amilorid und Omeprazol	207
8.3.6.	Cl^-/HCO_3^- -Carrier und Alkalisierung	209
8.3.7.	Inhibition des Cl^-/HCO_3^- -Carriers durch SITS und PBA	210
8.3.8.	Inhibition der Carboanhydrase mit Acetazolamid	211
8.3.9.	Puffer-Effekt hoher Konzentrationen der Substrate	212
8.3.10.	Koppelung von Ansäuerung und Alkalisierung	214
8.3.11.	Bilanz der Protonen- und Bikarbonatabgabe	215
8.3.12.	Modellbildung zum Mechanismus der Ansäuerung/Alkalisierung	215
8.4.	Permeation schwacher Säuren am Meerschweinchen-Colon	217
8.4.1.	Die Permeation von PABA am Colon: intra- und parazelluläre Anteile	217
8.4.2.	Transportmechanismen organischer Säuren am Colon	219
8.4.3.	Abhängigkeit der Permeation und Verteilung des PABA vom pH-Wert	221
8.4.4.	Ansäuerungsmechanismus und Permeation von PABA	223
8.4.5.	Contraluminaler Transport von PABA	226
8.4.6.	Untersuchungen zur unidirektionalen Aufnahme	228
8.4.7.	Hemmung der blutseitigen Aufnahme von PABA	229
8.5.	Permeation verschiedener Säuren im Vergleich zu PABA	232
8.5.1.	β -Naphtholorange	232
8.5.2.	Salicylsäure	234
8.5.3.	Ac-PABA	236
8.5.4.	Sulfanilsäure	237
9.	Schlußbetrachtungen	238
10.	Literaturverzeichnis	242

Zusammenfassung

Aufgabenstellung der vorliegenden Studie war die Untersuchung von Permeationsmechanismen organischer Säuren im Darm am Beispiel einer schwachen Carbonsäure. In vorangegangenen Studien konnte eine Sekretion anionischer Substrate am Jejunum und Colon beobachtet werden; Sulfon- und Carbonsäuren werden dabei über unterschiedliche Transportsysteme sezerniert. Eine Komplikation bei der Untersuchung der Transportmechanismen ergibt sich aus einer Kompartimentierung der Mukosa in zwei unterschiedlich von der oralen oder der systemischen Seite erreichbare metabolisierende Räume.

Als Versuchssubstrat wurde bewußt die von der Darmmukosa acetylierte Carbonsäure p-Aminobenzoesäure (PABA) gewählt. Mit der Verteilung des sauren Metaboliten N-Acetyl-PABA (Ac-PABA) als molecular probe konnte so der Weg der Säure im Permeationsprozeß verfolgt werden. Daneben konnte mit der Acetylierung eine weitere Metabolisierungsreaktion in Bezug auf die Kompartimentierung untersucht werden.

Als Versuchsmodell wurde die in vitro-Methode der isolierten Mukosa nach Lauterbach gewählt. Dabei bildet ein isoliertes Mukosapräparat eine Trennwand zwischen zwei Flußkammerhälften; das zumeist ^{14}C -markierte Substrat wird in der Regel einseitig mit dem Puffer zugegeben und am Versuchsende über Flüssigkeitszintillationszählung und zum Teil über Radio-Dünnschichtchromatographie bestimmt. Nicht-radioaktive Substrate wurden mit der HPLC analysiert.

Die Acetylierung erwies sich am Jejunum und Colon des Meerschweinchens als sättigungsfähige Reaktion; verglichen auf der Basis der Feuchtgewichte wurde dabei im Colon mehr PABA umgesetzt. Bei der Untersuchung der Verteilung des Metaboliten im Versuchssystem wurde das Konjugat an den Präparaten des menschlichen und des Meerschweinchen-Jejunums annähernd vollständig in das jeweilige Angebotsmedium zurücksezerniert. Damit erweist sich auch die Acetylierung der PABA am Jejunum als eine kompartimentierte Reaktion. Auch am Colon erwies sich die Verteilung des Metaboliten als von der Angebotsseite des Substrates bestimmt; am humanen Präparat wurde dabei der größte Anteil des Ac-PABA in die Angebotsmedien zurücksezerniert. Beim Meerschweinchen fand sich der größte Anteil an Ac-PABA immer auf der Blutseite; gleichwohl ist auch hier die zur Lumenseite abgegebene Menge bei einem lumenseitigen Angebot 6-10mal größer als bei einem blutseitigen Angebot. Gegenüber der Glukuronidierung und Sulfatierung von Fremdstoffen im Colon konnte mit der Acetylierung von PABA zum ersten Mal eine Kompartimentierung auch an diesem Darmabschnitt nachgewiesen werden. Die in vitro aufgefundenen Verteilungsmuster der Säuren konnten bei in vivo-Perfusionsexperimenten am Meerschweinchen-Jejunum und Colon bestätigt werden.

Die Existenz zweier metabolisierender Räume im Jejunum konnte über eine selektive Beeinflussung des lumenseitigen Kompartiments bestätigt werden. Eine lumenseitige Vorinkubation der Mukosae mit einem calciumfreien und EDTA-haltigen Medium oder einer hypertonen Lösung mit vergleichsweise geringer Osmolarität (Zellobiose, 0.6 Osmol/l) steigerten bei einem lumenseitigen Angebot des Substrates die Acetylierung, während die Vorinkubation mit einem Medium höherer Osmolarität (Natriumcyclamat, 2 Osmol/l) die Metabolisierung und die Abgabe des Ac-PABA zur Lumenseite drastisch einschränkte. Bei einem blutseitigen Substratangebot blieb dagegen der zur Angebotsseite zurücksezernierte Anteil an Ac-PABA weitgehend erhalten, so daß der blutseitig erreichbare Raum durch die lumenseitige Noxe nur wenig beeinflußt erscheint. Der zur Lumenseite abgegebene Anteil war jedoch auch in diesem Fall eingeschränkt; die gleichzeitig zu beobachtende Akkumulation des Tracers im Gewebe deutet dabei auf die Schädigung eines Carriermechanismus der Säuren in der apikalen Membran hin.

Die Vermutung, das acetyliertes PABA über Carriermechanismen aus den metabolisierenden Räumen abgegeben wird, sollte mit dem Einsatz eines nicht-dissozierbaren Analogons von PABA, dem Aminoacetophenon (AAP), überprüft werden. Tatsächlich fand sich für dieses Substrat am Meerschweinchen-Colon keine Abhängigkeit in der Abgabe des Metaboliten Ac-AAP von der Angebotsseite. Am Jejunum wurde Ac-AAP bei blutseitigem Angebot in gleichen Anteilen zu beiden Seiten, bei lumenseitigem Angebot im Verhältnis 2:1 zugunsten der Angebotsseite abgegeben. Eine Schädigung des lumenseitigen Raumes durch eine hyperosmolare Vorinkubation führte auch am Dünndarm zu einem von der Angebotsseite unabhängigen Verteilungsmuster.

Für die transepitheliale Permeation der PABA wurde am Meerschweinchen-Jejunum eine Netto-Sekretion nachgewiesen. Die Sekretion ist von einem höheren Gewebsgehalt bei blutseitigem Angebot begleitet. Im Versuchsverlauf konnte eine Alkalisierung des lumenseitigen und Ansäuerung des blutseitigen Mediums beobachtet werden. Eine anaerobe Inkubation führte zu einem Ausfall der Alkalisierung. Parallel dazu kam es zu einem Anstieg der Gewebsgehalte bei lumenseitigem Angebot von PABA und zu einer Umkehr der Sekretion in eine Netto-Resorption. Am humanen Dünndarmpräparat wurde für PABA eine Netto-Resorption nachgewiesen. Als treibende Kraft der Sekretion oder Resorption kann ein beim Meerschweinchen alkalisches und beim Menschen saures Mikroklima im Bereich der apikalen Membran diskutiert werden.

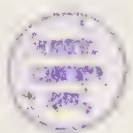
Die Sekretion von PABA konnte am Meerschweinchen-Jejunum nicht durch blutseitig gegebenes Phenoxybenzamin (PBA) eingeschränkt werden. Damit ordnet sich der Sekretionsmechanismus dieser Säure dem der Salicylsäure zu, während die mit PBA inhibierbare Sekretion des β -Naphtholorange über ein eigenständiges Transportsystem vermittelt wird.

Im Gegensatz zum Jejunum findet sich für PABA im Meerschweinchen-Colon eine sehr ausgeprägte Netto-Resorption. Bei einem beidseitigen Angebot war nach dreistündiger Inkubation der Tracer in einem Verhältnis 48:1 annähernd vollständig zur Blutseite übergetreten. Im gleichen Zeitraum änderte sich der pH-Wert des lumen-seitigen Inkubates von 7.00 auf 4.22; diese starke Ansäuerung könnte damit die treibende Kraft der Resorption darstellen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden eine Reihe von Versuchen zur Hemmung des Ansäuerungsmechanismus durchgeführt; dabei konnten neben dem Einfluß dieser Maßnahmen auf die Resorption des PABA auch Hinweise auf den Mechanismus der lumenseitigen Ansäuerung und der parallel auftretenden Alkalisierung des blut-seitigen Inkubates erhalten werden. Die Ansäuerung konnte über eine anaerobe Inkubation eingeschränkt werden und war von extrazellulärem Kalium abhängig; lumenseitig gegebenes Ouabain scheint den Ansäuerungsmechanismus direkt zu inhibieren. Sowohl die Ansäuerung als auch die Alkalisierung wurden durch Acetazolamid eingeschränkt. Die blutseitige Alkalisierung konnte über eine Depletion der Chloridionen im blutseitigen Medium und über blutseitig gegebenes SITS gehemmt werden. Als Mechanismus der Ansäuerung kann die Aktivität einer K^+/H^+ -ATPase in der apikalen Membran, für die Alkalisierung ein Cl^-/HCO_3^- -Carrier in der basolateralen Membran diskutiert werden. Bezogen auf den Transport ergab sich eine gute Korrelation zwischen dem Anteil des freien PABA am Versuchsende und der Resorptionsquote; ionisiertes PABA nimmt nach dem Verlauf der Regressionsgeraden nicht an der transepithelialen Permeation teil.

Um neben der lumenseitigen Aufnahme der Säure auch den blutseitigen Transportmechanismus zu untersuchen, wurden Influxexperimente durchgeführt; PABA wurde dabei lumen- oder blutseitig in verschiedenen Konzentrationen in einem Zeitraum von einer Minute angeboten. Die Aufnahme in das Gewebe konnte als Superposition eines sättigungsfähigen und eines konzentrationsproportionalen Anteils beschrieben werden. Während dabei in der basolateralen Membran der sättigungsfähige Anteil mit einer maximalen Aufnahme bei $55 \text{ nmol/cm}^2\text{min}$ und einer halbmaximalen Aufnahme bei 18 mM dominierte, fand sich in der lumenseitigen Membran nur eine maximale Aufnahmerate von $1.6 \text{ nmol/cm}^2\text{min}$ und eine halbmaximale Aufnahme bei 1 mM PABA. Der konzentrationsproportionale Anteil war dagegen in beiden Membransystemen mit $5.3 \cdot 10^{-4}$ und $6.7 \cdot 10^{-4} \text{ cm/min}$ annähernd gleich.

Die Substratspezifität des blutseitigen Aufnahmemechanismus von PABA wurde über eine Co-Administration verschiedener Säuren untersucht; inhibitorisch wirkten dabei die Carbonsäuren Essigsäure, Octansäure, Milchsäure, Benzoesäure, Salicylsäure,



Ac-PABA, PAH und das Glukuronid des p-Nitrophenols. Im Gegensatz hierzu nahmen Anionen wie Sulfat, β -Naphtholorange oder Nitrophenylsulfat keinen Einfluß auf die Aufnahmerate.

Die Existenz verschiedener Transportsysteme bestätigte sich auch in Versuchen, bei denen PABA und β -Naphtholorange gleichzeitig an einem Mukosapräparat angeboten wurden; hierbei konnte parallel die Sekretion der Sulfonsäure und die Resorption der PABA beobachtet werden. Für die Salicylsäure und für Ac-PABA findet sich dagegen am Colon wie bei PABA eine Netto-Resorption. Zusammenfassend weisen damit alle Befunde auf ein vergleichsweise unspezifisches Transportsystem der Carbonsäuren in der blutseitigen Membran hin; Sulfonsäuren werden dagegen über andere Carriersysteme transportiert. Dem Resorptionsmechanismus der Carbonsäuren könnte eine besondere Bedeutung bei der Aufnahme saurer Nahrungsbestandteile aus dem Colon herbivorer Spezies zukommen.

Für verschiedene Pharmaka wurden schon früh aktive Aufnahmemechanismen aus dem Darmlumen aufgrund der Ähnlichkeit mit essentiellen Nahrungsbestandteilen diskutiert. Die Kenntnis sekretorischer Mechanismen der Abgabe von Xenobiotika über die Mukosa ist dagegen neueren Datums (Israili und Dayton, 1984). So kommt es nach intravenöser Gabe verschiedener Herzglykoside zu einer Anreicherung im Darmlumen weit über der Konzentration im Serum (Lauterbach, 1981). Eine Sekretion konnte auch bei quaternären Ammoniumbasen beobachtet werden (Lauterbach, 1982). In der Gruppe der organischen Säuren findet sich am Meerschweinchen-Jejunum bei in vitro-Untersuchungen eine Sekretion der Sulfanilsäure (Sund und Lauterbach, 1978), des β -Naphtholorange (Kilian und Lauterbach, 1978), der Salicylsäure (Lauterbach und Steinke, 1981), des Chlorphenolrot (Lauterbach, 1975), der Trimethoxybenzoesäure (Kolassa und Mitarbeiter, 1977) und der Harnsäure (Sprakties, 1983). Eine Sekretion von β -Naphtholorange konnte auch in vivo am Jejunum der Ratte und des Meerschweinchens (Lauterbach, 1977, Kilian und Lauterbach, 1978, Lauterbach, 1983) wie am vaskulär perfundierten Mäuse-Jejunum (Wollenberg, 1983) nachgewiesen werden. Wie Inhibitionsstudien mit Phenoxybenzamin ergaben, erfolgt der Transport von β -Naphtholorange und Salicylsäure wahrscheinlich über zwei voneinander unabhängige Transportsysteme.

Mit Systemen der intestinalen Sekretion erweist sich der Darm neben Leber und Niere als drittes, wichtiges System zur Elimination von Xenobiotika. Für den Transport der Herzglykoside (Lauterbach, 1981) wie der quaternären Basen (Turnheim und Mitarbeiter, 1977b) werden Carriermechanismen in der luminalen- und in der contraluminalen Membran diskutiert. Ein sekretorischer Mechanismus kann bei oraler Applikation zu einer komplexen zeit- und konzentrationsabhängigen Aufnahmekinetik führen. So kommt es beispielsweise bei einer steigenden Angebotskonzentration von N-Methylscopolamin im Lumen zu einer Sättigung der Rücksekretion und, daraus folgend, zu einer Steigerung der anteilmäßig resorbierten Menge (Turnheim und Lauterbach, 1980).

Im Gegensatz zu den vorgenannten Transportvorgängen wird für viele Säuren oder Basen in der Literatur eine ausschließlich passive Permeation diskutiert. Nach der non-ionic diffusion Theorie ist dabei die Transferrate vom pK-Wert und der Lipophilie der freien Säure oder Base wie von dem pH-Wert bestimmt (Schanker und Mitarbeiter, 1958, Hogben und Mitarbeiter, 1959, Lanman und Mitarbeiter, 1971, Schanker, 1959). Die ionisierte Form nimmt aufgrund ihrer in der Regel sehr viel höheren Polarität nur im geringen Umfang am Permeationsprozeß teil; es kommt zu einer Anreicherung in dem Raum, in dem die Verbindung stärker ionisiert vorliegt (pH-Partition Theorie, Shore und Mitarbeiter, 1957). Untersuchungen zur steady-state Verteilung zwischen Darmlumen und Gewebe am Ratten-Jejunum ergaben Hinweise auf einen sauren pH-Wert im Bereich der apikalen Plasmamembran, für den Hogben und Mitarbeiter (1959) den Begriff des sauren Mikroklimas einführten. Der direkte experimentelle Nachweis dieser Hypothese konnte in neuerer Zeit am Jejunum der Ratte und des Menschen in einer Vielzahl von Untersuchungen geführt werden (Lucas, 1976, Högerle und Winne, 1983, Daniel und Mitarbeiter, 1985, Shiau und Mitarbeiter, 1985). Eine vom sauren Mikroklima unterstützte Resorption organischer Säuren im Jejunum der Ratte wird von Blair und Mitarbeitern (1974, 1981) für die Folsäure und Propanolol wie von Naupert und Rommel (1975) für die kurzkettigen Fettsäuren diskutiert.

Eine Netto-Sekretion saurer Verbindungen am Meerschweinchen-Jejunum ist mit einer rein passiven Permeation gemäß der non-ionic-diffusion Theorie und einem sauren Mikroklima nicht vereinbar. Die Aufgabenstellung der vorliegenden Studie war die Aufklärung dieses Widerspruches, wobei sich hypothetisch zwei Erklärungen anbieten: (1) am Meerschweinchen-Jejunum wird kein saures Mikroklima ausgebildet und (2) die untersuchten Säuren werden carriervermittelt aktiv transportiert. Beide Hypothesen schließen einander nicht aus, so daß auch eine Kombination beider Mechanismen möglich ist. In vorangegangenen Untersuchungen konnte eine Sekretion der Salicylsäure nur an der isolierten Mukosa des Jejunums, nicht jedoch am Colon beobachtet werden (Lauterbach, 1983). Daher erschien es

sinnvoll, die Permeationsmechanismen sowohl im Bereich des Jejunums wie des Colons zu untersuchen.

Als Modellsubstrat dieser Studie wurde eine Verbindung entsprechend den nachfolgenden Kriterien gewählt: (1) ein pK_a in der Nähe des Neutralpunktes, (2) eine hohe Permeabilität der freien Säure, (3) ein überschaubarer Metabolismus, (4) eine geringe Toxizität, (5) eine geringe Proteinbindung, (6) eine einfache und empfindliche Analyse. Alle aufgeführten Kriterien werden im hohen Maße von der p-Aminobenzoesäure (PABA) erfüllt. Als aromatische Carbonsäure ist PABA in der freien Form mit einem Verteilungskoeffizienten von 5,5 (Octanol/Wasser) eine vergleichsweise lipophile Substanz (Laznické und Mitarbeiter, 1987). PABA gehört mit einem pK_a von 4,93 zur Gruppe der schwachen Säuren und sollte damit in seiner Permeabilität besonders empfindlich auf eine Änderung der Wasserstoff-Ionenkonzentration im Bereich der Permeabilitätsbarrieren reagieren. Die Säure wird von der Darmukosa der Ratte ausschließlich zu N-Acetyl-p-aminobenzoesäure (Ac-PABA) umgesetzt (Yasuhara und Mitarbeiter, 1978); dabei ist das Konjugationsprodukt eine ebenfalls schwache Säure mit einem pK_a von 4,23. Die Toxizität von PABA muß bei einer LD_{50} bei Maus und Ratte von 2,85 g/kg (oral, Scott und Robbins, 1942) und beim Kaninchen mit 2 g/kg (i.v. Richards, 1942) als sehr gering angesehen werden. Die Proteinbindung ist mit einem Anteil der ungebundenen Fraktion der Säure von 70,4 % im humanen Plasma oder 91,0 % im Plasma der Maus gegenüber der Salicylsäure mit 6,3 % im humanen Plasma und 41,8 % im Mäuse-Plasma gering (Laznické und Mitarbeiter, 1987). Über eine radioaktive Markierung des Kohlenstoffs in der Carboxylgruppe konnte PABA über Flüssig-Szintillationszählung entsprechend den spezifischen Aktivitäten in einer Konzentration von 10 nM bestimmt werden.

p-Aminobenzoesäure ist eine in der Natur weit verbreitete Verbindung und im biologischen Material annähernd aller Spezies nachzuweisen. PABA ist als biochemische Vorstufe der Folsäuresynthese für Bakterien ein essentieller Nahrungsbestandteil (bacterial growth factor, Vitamin B_x). Pharmakologisch wurde PABA zur The-

rapie der Rickettsiose eingesetzt, ist aber mit dem Aufkommen wirksamerer Pharmaka wie dem Chloramphenicol und den Tetracyclinen obsolet geworden. PABA wird aufgrund seiner hohen Extinktion im UV-Bereich häufig als Lichtschutzfaktor in diversen Sonnenschutzpräparaten eingesetzt.

Über den Mechanismus der enteralen Permeation von PABA liegen in der Literatur widersprüchliche Angaben vor. Spencer und Mitarbeiter untersuchten 1966 die Permeation von PABA und verwandter Substanzen bei verschiedenen Spezies am everted sac des Jejunums nach der Methode von Wilson und Wiseman (1954). Dabei wurde eine Anreicherung von PABA, Benzoesäure, p-Chlorbenzoesäure und p-Methoxybenzoesäure auf der serosalen Seite bei Maus und Flughörnchen, jedoch keine asymmetrische Verteilung bei Ratte und Hamster festgestellt. Arvanitakis und Mitarbeiter (1978) beschrieben am Jejunum und Ileum der Ratte eine bis zu einer Konzentration von 50 mM nicht sättigungsfähige und nicht über Glukose oder Natrium stimulierbare Resorption von PABA. Im Gegensatz zu diesen Befunden beobachteten Gardner und Mitchell (1981) an der Ratte eine Anreicherung von PABA in der serosalen Lösung um den Faktor 1,7.

Ausführliche Untersuchungen zur Permeation von PABA wurden von Yasuhara an der Ratte durchgeführt. PABA wurde dabei am Jejunum, jedoch nicht am Colon, gegen einen Konzentrationsgradienten resorbiert. Die Transferraten im Vergleich einer everted / non-everted sac Präparation waren für PABA am Jejunum in der resorptiven Richtung um den Faktor 5 größer als in sekretorischer Richtung. Die wesentlich geringeren Transferraten des Metaboliten Ac-PABA waren dagegen in beiden Richtungen identisch. Die Aufnahme und der Transfer von PABA, jedoch nicht von Ac-PABA, konnten in vivo wie in vitro über eine Behandlung der luminalen Membran des Jejunums mit Quecksilberchlorid, 2,4 di-Nitrophenol und 4-Chlormercuribenzolsulfonsäure gehemmt werden (Yasuhara und Mitarbeiter, 1979a).

Konnte mit den Detergentien Tween 80, Triton X-100, Natriumdodecylsulfat und Cetyltrimethylammoniumbromid in situ die Aufnahme

von PABA am Jejunum inhibiert werden, kam es für Ac-PABA am Jejunum und für beide Substanzen am Colon zu einer Steigerung der Resorption (Yasuhara und Mitarbeiter, 1979b). Die Befunde wurden von Yasuhara mit der Existenz eines Transportmechanismus von PABA in der lumenseitigen Membran erklärt. Auffallend war in allen Untersuchungen am Jejunum die asymmetrische Verteilung des intrazellulär gebildeten Metaboliten Ac-PABA zur Lumenseite nach lumenseitigem Substratangebot (Yasuhara und Mitarbeiter, 1984). Aus Versuchen der trans-Stimulation des Efflux von Ac-PABA aus isolierten Bürstensaum-Vesikeln schloß Yasuhara auf einen vermittelten Auswärtstransport dieser Verbindung in der apikalen Membran (Yasuhara und Mitarbeiter, 1983).

PABA wird im Bereich geringer Angebotskonzentrationen von der Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums und Colons intrazellulär vollständig zu N-Acetyl-p-aminobenzoesäure (Ac-PABA) umgesetzt. Dieser "first-pass" Metabolismus des Substrates eröffnete die Möglichkeit, die Verteilung einer nur intrazellulär vorliegenden Säure vom Enterocyten in das lumen- und blutseitige Inkubationsmedium zu untersuchen. Ein zweiter, interessanter Aspekt ergibt sich aus der Verteilung anderer saurer Konjugate wie den Glukuroniden des β -Naphthols (Sund und Lauterbach, 1986) oder des Oestradiols (Schorn, 1986). Hier konnte am Jejunum eine von der Seite des Angebotes abhängige Verteilung der Metaboliten beobachtet werden; der überwiegende Anteil an gebildetem Glukuronid wird dabei immer in die Inkubationslösung der Angebotsseite rücksezerniert. Bei unterschiedlichen Permeabilitäten von Metabolit und Substrat kann durch diesen Effekt die Aufnahme einer Verbindung verzögert werden oder, bei einer sehr geringen Permeabilität des Metaboliten, ein Teil der Dosis das Colon erreichen und dort mit den Faeces ausgeschieden oder bakteriell umgesetzt werden. Damit stünde der Mukosa des Darmes neben der Sekretion ein weiterer Mechanismus zur Detoxikation und Ausscheidung oral gegebener Xenobiotica zur Verfügung.

Als experimentelles Modell wurde die Methode der isolierten Mukosa nach Lauterbach (1971, 1977) gewählt. Eine mögliche Alternative

im Bereich der in vitro-Methoden wäre der häufig eingesetzte everted sac nach Wilson und Wiseman (1954). In einem Vergleich beider Methoden erwies sich im histologischen Befund die isolierte Mukosa als überlegen (Gardner und Mitarbeiter, 1984). Das isolierte Gewebe war nach einstündiger Inkubation noch vollständig intakt, wohingegen im Präparat des everted sac schon nach 20 minütiger Inkubation eine fast völlige Zerstörung der oberen Villus-Zellen zu beobachten war. Darüberhinaus fehlt dem Modell der isolierten Mukosa die Muskularis als zusätzlicher Diffusionsbarriere und Metabolisierungsraum. Bei einer kritischen Bewertung weist die isolierte Mukosa gegenüber anderen Methoden und speziell auch gegenüber in vivo-Untersuchungen generell eine Reihe von Vorteilen auf:

- die einfache Präparation, in der schnell und reproduzierbar eine große Anzahl verschiedener Inkubationsbedingungen eingesetzt werden kann
- beide Seiten des Gewebes sind im Versuchsverlauf frei zugänglich
- in fast allen Fällen ist es möglich, eine standardisierte Inkubationsbedingung als interne Kontrolle mitzuführen
- über eine Markersubstanz des extrazellulären Raumes kann sowohl die intrazelluläre Konzentration wie der zelluläre und parazelluläre Anteil der Permeation ermittelt werden

Den aufgeführten Vorteilen stehen bei der in vivo-Perfusion des Darmlumens der geringere Diffusionsweg des Substrates auf der contraluminalen Seite des Präparates wie auch ein in der Regel besserer Erhaltungszustand des Gewebes gegenüber. Um die physiologische Signifikanz der in vitro aufgefundenen Mechanismen zu überprüfen, wurden aus diesem Grund Kontrollexperimente in einem einfachen in vivo-Modell durchgeführt.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Arbeit in drei Teile mit jeweils eigenem Ergebnis- und Diskussionsteil aufgeteilt. Der erste Teil geht auf die Untersuchungen zum Metabolismus und zu der Metabolitenverteilung ein; in der Diskussion werden darüberhinaus

generelle Aspekte der Kompartimentierung besprochen und der Versuch einer Einordnung aller bisher untersuchten Metabolisierungsreaktionen unternommen. Der zweite und dritte Abschnitt behandelt die Untersuchungen zum Permeationsmechanismus am Jejunum und Colon ohne eine Auftrennung der Metaboliten. Bei der Untersuchung der Permeation am Colon konnte zum ersten Mal die Netto-Resorption einer Säure am Meerschweichen-Darm belegt werden. Aus diesem Grund und entsprechend den damit verbundenen, ausführlichen Untersuchungen zum Mechanismus der Sekretion saurer und basischer Einheiten wurde das Colon ausführlicher behandelt.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

2.1.1. Radioaktiv markierte Verbindungen

p-Amino-(carboxyl- ^{14}C)-benzoesäure

spezifische Aktivität: Batch 8/9	24 mCi/mmol = 0,89 GBq/mmol
Batch 11	56 mCi/mmol = 2,07 GBq/mmol
Batch 12	55 mCi/mmol = 2,04 GBq/mmol

Reinheitsprüfung: Verunreinigungen < 1% in allen Chargen

Stammlösung 1 mM in 50% (v/v) Äthanol bei -18°C

Amersham Buchler GmbH & Co.KG, Braunschweig

(^{35}S)- β -Naphtholorange

Eigensynthese des Labors aus (^{35}S)-Sulfanilsäure

spezifische Aktivität Sulfanilsäure: Batch 8/84 2,2 Ci/mmol =
81,4 GBq/mmol, 4.03.1985

Reinheitsprüfung β -Naphtholorange: Verunreinigungen 0,6%

Stammlösung in wässriger Lösung bei -18°C

Sulfanilsäure von: Amersham Buchler GmbH & Co.KG, Braunschweig

(1,2- ^3H)-Polyethylenglycol 900

spezifische Aktivität: Lot Nr. 1541-063	6,0 mCi/g
Lot Nr. 2038-156	3,3 mCi/g

Molekulargewicht zwischen 800 und 1000

Stammlösung in wässriger Lösung bei -18°C

New England Nuclear, St.Albany, Boston, Mass., USA

(7- ^{14}C)-Salicylsäure

spezifische Aktivität: Lot Nr. 1153-206 51,7 mCi/mmol

Reinheitprüfung: Verunreinigung < 0,5%

Stammlösung in 20% äthanolischer Lösung (v/v) bei -18°C

New England Nuclear, St.Albany, Boston, Mass., USA

(^{35}S)-Sulfanilsäure

spezifische Aktivität: Batch 8/84 2,2 Ci/mmol = 81,4 GBq/mmol
4.03.1985

Reinheitsprüfung: Reinheit 76,7%, Angabe ab Werk 96%

Stammlösung in wässriger Lösung bei -70°C

Amersham Buchler GmbH & Co.KG, Braunschweig

2.1.2 Synthese von N-Acetyl-p-aminobenzoesäure (Ac-PABA)

Radioaktiv markiertes Ac-PABA war im Handel nicht erhältlich und wurde auf biologischem Wege in unserem Labor aus aktivem ^{14}C -PABA hergestellt. Da zur Konjugation kein unmarkiertes PABA zugegeben wurde, entspricht die spezifische Aktivität der umgesetzten Substanz der der Ausgangsverbindung mit 24 mCi/mmol.

Zur Synthese wurde ein Gramm Mukosagewebe des Meerschweinchen-Jejunums, wie in Abschnitt 2.4.1. beschrieben, isoliert und grob zerkleinert. Diesem Gewebe wurde in einem 100 ml Erlenmeyerkolben 20 ml Krebs-Tris-Glucose-Mannit Medium, pH 7,0, mit 10 μCi ^{14}C -PABA (20,5 μM) zugegeben und bei 37°C unter Sauerstoffbegasung inkubiert. Bei der Chromatographie eines Aliquots des Inkubates waren 40% der eingesetzten Menge an PABA nach einstündiger Inkubation zu Ac-PABA umgesetzt. Nach 2 Stunden wurde die Inkubation abgebrochen.

Die Inkubationslösung wurde über eine Zentrifugation vom Gewebe getrennt, mit 1N HCl auf einen pH-Wert von 2,5 angesäuert und dreimal mit 70 ml Chloroform/Äthanol (6:1, (v/v)) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend durch Überblasen mit Stickstoff eingeengt. Bezogen auf die eingesetzte Menge zu Beginn der Synthese, fanden sich nach der Extraktion 1,24% der radioaktiven Markierung in der wässrigen und 94,7% in der organischen Phase.

Der verbliebene Rückstand wurde dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Zu diesem Zweck wurde das Substanzgemisch in 500 μl Äthanol aufgenommen und in einem 18 cm breiten Streifen auf einer Kieselgel 60 Aluminiumfolie (Merck, Darmstadt) ohne Fluoreszenzindikator aufgetragen (Laufmittel I, 2.7.2). Die Lage der interessierenden Bande an Ac-PABA wurde über Radiodünnschichtchromatographie (LB 2723 mit Berthold Dual-Ratemeter-Integrator LB 242K und Zweikanalschreiber der Fa. Siemens) festgestellt und die entsprechende Fläche ausgeschnitten. Eluiert wurde Ac-PABA über einen Zeitraum von 2h in 110 ml Äthanol bei Raumtemperatur.

Das Eluat wurde durch Überblasen mit Stickstoff eingeengt und in 2 ml A.dest. wieder aufgenommen. Bei diesem Prozeß erkennbare Verunreinigungen in Form eines bräunlichen, schmierigen Filmes im Kolben konnten durch Ausschütteln der Lösung mit Petroläther und einem weiteren Ausschütteln mit Diäthyläther entfernt werden. Die radioaktiv markierte Verbindung trat bei dieser Maßnahme nur in Spuren in die organischen Phasen über. Als Gesamtausbeute der Synthese konnten insgesamt 5,31 µCi oder 53,1% der eingesetzten Menge an PABA als ^{14}C -Ac-PABA gewonnen werden.

2.1.3 Unmarkierte Verbindungen

p-Acetamidoacetophenon, (Ac-AAP), $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{N}$, Reinheit >98%
(zur Synthese), Lot Nr.364460, Merck, Darmstadt

p-Acetamidobenzoessäure, (Ac-PABA), $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_3\text{N}$, Reinheit >98%,
Lot Nr.3108PD, Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim

p-Acetamidohippursäure, (Ac-PAH), $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{N}_2$, recryst.4/84,
Lot MP131-132, Newport Pharmaceutical International, Monrovia,
California, USA

Acetazolamid, (N-(5-Sulfanyiyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-acetamid),
Lot Nr.64F0327, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Amilorid-HCl, Lot Nr.84F0168, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

p-Aminoacetophenon, (AAP), $\text{C}_8\text{H}_9\text{ON}$, Reinheit >98 %, Aldrich-Chemie
GmbH, Steinheim

p-Aminobenzoessäure, (PABA), $\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$, Reinheit 'rein', Control F,
Serva Feinbiochemica GmbH&Co, Heidelberg

p-Aminohippursäure, (PAH), $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3\text{N}_2$

Ammoniumamidosulfonat, Reinheit >99%, zur Analyse, Lot
Nr.70165296, Merck, Darmstadt

L(+)Ascorbinsäure , Reinheit 'reinst', fein gepulvert, Lot
Nr.2697400, Merck, Darmstadt

Benzoessäure, $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$, Reinheit 'zur Analyse', Lot Nr.70120445,
Merck, Darmstadt

BISTRISPROPAN, (1,3-bis-(tris-(Hydroxymethyl)methyl-amino)-propan), $\text{pK}_{a1}=9,0$, $\text{pK}_{a2}=6,8$ (25°C), Lot Nr.44F5617, Sigma Chemie
GmbH, Deisenhofen

D-Cellobiose, (4-(O-D-Glucopyranosyl)-D-glucopyranose), Reinheit 'Analytical grade', Control F, Serva Feinbiochemica GmbH&Co, Heidelberg

Na⁺-Cyclamat, (Cyclohexansulfaminsäure Natriumsalz), C₆H₁₂NO₃S Na, Reinheit 99.5-99.9 %, Lot Nr.39385, Schuchardt, München

Digoxin, (3,12β,14β-Trihydroxy-5β-card-20(22)-enolid-3-ridigitoxosid), Lot Nr.3274460, Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe

Ca²⁺-Gluconat, (1,2,3,4,5-Pentahydroxycapronsäure) Hemicalciumsalz, Grade VII, Lot Nr.112F-0740, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Na⁺-Gluconat, (1,2,3,4,5-Pentahydroxycapronsäure) Natriumsalz, Reinheit >98 %, Grade V, Lot Nr.114F-0519, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Mg²⁺-Gluconat, (1,2,3,4,5-Pentahydroxycapronsäure) Hemimagnesiumsalz, Reinheit >98 %, Grade VI, Lot Nr.84F-0422, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

K⁺-Gluconat, (1,2,3,4,5-Pentahydroxycapronsäure) Kaliumsalz, Reinheit >98 %, Grade III, Lot Nr.15F0061, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Gluconsäure, (1,2,3,4,5-Pentahydroxycapronsäure), 50 % in Wasser (w/w), Lot Nr.45F3464, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

HEPES, (N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure), Reinheit 'pa', pK_s=7.55 (20°C), Lot D5, Serva Feinbiochemica GmbH&Co, Heidelberg

Na⁺-EDTA, Äthylendiamintetraessigsäure di-Natriumsalz, Reinheit >=99.5 % 'puriss', Lot Nr.138489K, Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm

L(+)-Lactat, (2-Hydroxypropionsäure), Reinheit >98 %, Grade L-1, Lot Nr.24F0018, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

N-Methylscopolamin, (N-Methyl-O-tropylscopiniumbromid), Boehringer, Mannheim

β-Naphtholorange, Orange II, (4-((2-Hydroxy-1-naphthyl)-azo)-benzol-sulfonsäure), Reinheit 'für die Mikroskopie', Lot Nr. 3007822, Merck, Darmstadt

N-Naphtyl-1-äthylendiammoniumdichlorid (NEDA), Reinheit >99% zur Analyse, Lot Nr.70148451, Merck, Darmstadt

Neomycinsulfat, (O-2,6-Diamino-2,6-dideoxy-α-D-glucopyrasosyl-(1-4)-O-(O-2,6-diamino-2,6-dideoxy-β-L-idopyranosyl-(1-3)-β-D-ribofuranosyl-(1-5)-2-deoxy-D-streptamin) Sulfat, 19.03.80, Kontroll Nr.18816, Byk Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH, Konstanz

p-Nitrophenyl- β -D-Glukuronid, freie Säure, Lot Nr.34F3884, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

p-Nitrophenylsulfat, K⁺-Salz, Lot Nr.92F-5034, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Omeprazol, 10.03.86, Lot Nr.201/84, Hässle, Schweden

Ouabain, g-Strophanthin, (1 β ,3 β ,5,11 α ,14,19-Hexahydroxy-5 β -card-20(22)-enolid-3-L-rhamnosid), Reinheit >99 % 'reinst', Lot Nr. 3915276, Merck, Darmstadt

Phenoxybenzamin, gelöst in Nedergaardscher Lösung (25 ml Äthanol abs., 25,2 ml 1,2-Propandiol, 50 μ l HCl 1N)

Salicylsäure, (2-Hydroxybenzoesäure), Reinheit 'reinst', fein gepulvert, Merck, Darmstadt

SITS, (4-Acetamido-4'-isothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonsäure) di Na⁺-Salz, predominantly trans-isomer, Reinheit 80-90 %, Lot Nr.25F7707, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Sulfanilsäure, (4-Aminobenzolsulfonsäure), Reinheit >99 % 'pro Analysis', Lot Nr.9647114, Merck, Darmstadt

TRIS, (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), pK_a=8.1 (25°C), Reinheit >99 % 'pro Analysis', Lot Nr.529K866682 u. 343K3216082, Merck, Darmstadt

2.2. Lösungen

2.2.1 Versuchspuffer

2.2.1.1 Krebs-Tris Puffer pH 7,0

Dieser Puffer wurde aus Stammlösungen angesetzt und mit einer Einstabmeßkette (Schott N6000A, Orion digital ionanalyzer 501) bei Raumtemperatur auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Dieser pH-Wert entsprach einem pH-Wert von 7,00 bei 37°C (Good und Mitarbeiter, 1966). In den Untersuchungen zum Einfluß des pH-Wertes auf die Permeation von PABA am Meerschweinchen-Colon wurde der pH-Wert über eine Blutgasmeßkette (Kapillarelektrode G297/G2, Digital pH Meter PHM52, Radiometer Copenhagen) bei 37°C auf einen pH-Wert von 7,00 eingestellt.

Zusammensetzung des Puffers: 106,3 mM NaCl, 7,7 mM KCl, 3,3 mM CaCl_2 , 1,1 mM MgSO_4 , 32,3 mM Tris-HCl pH 7,4 20°C, 1,0 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,4 20°C.

2.2.1.2 Krebs-Hepes und Krebs-Bistris Puffer

In diesen Puffern wurde der Anteil an Tris-HCl durch Hepes oder Bistrispropanpuffer ersetzt. Aus Gründen der geringen Löslichkeit des Kalziumphosphates bei höheren pH-Werten wurde in allen Puffern die eingesetzte Menge an Kalziumchlorid und Phosphat halbiert. Der pH-Wert wurde als pH-Wert des Hepes- oder Bistris-Puffers über eine Einstabmeßkette (Schott N6000A, Orion digital ionanalyzer 501) bei Raumtemperatur eingestellt und nach Ansetzen des Gesamtpuffers mit einer Blutgasmeßkette (Kapillarelektrode G297/G2, Digital pH Meter PHM52, Radiometer Copenhagen) bei 37°C überprüft und, wenn notwendig, auf den Sollwert eingestellt.

Zusammensetzung des Hepes-Puffers: 108,4 mM NaCl, 7,9 mM KCl, 1,7 mM CaCl_2 , 1,1 mM MgSO_4 , 33,0 mM Hepes-HCl, 0,5 mM Na-Phosphat-Puffer.

Zusammensetzung des Bistris-Puffers: 108,4 mM NaCl, 7,9 mM KCl, 1,7 mM CaCl_2 , 1,1 mM MgSO_4 , 33,0 mM Bistris-HCl, 0,5 mM Na-Phosphat-Puffer.

2.2.1.3 Tris-Puffermedien, Cl^- -frei, pH 7,00

Zur Untersuchung des Einflusses von Chlorid-Ionen auf den ionalen Transport und die Permeation des PABA am Meerschweinchen-Colon wurden zwei Puffersysteme ohne Chlorid-Ionen eingesetzt. In einem dieser Puffersysteme wurden dabei alle Cl^- -Ionen durch Sulfat (Sulfat-Puffer), in dem anderen alle Anionen durch Gluconsäure (Gluconat-Puffer) ersetzt. Im Gluconat-Puffer war somit neben dem Chlorid keines der zweiwertigen Anionen enthalten. Der pH-Wert des Puffers wurde nach Ansetzen des Gesamtpuffers mit einer Blutgasmeßkette (Kapillarelektrode G297/G2, Digital pH Meter PHM52, Radiometer Copenhagen) bei 37°C auf einen pH-Wert von 7,00 eingestellt.

Zusammensetzung des Sulfat-Puffers: 75,9 mM Na_2SO_4 , 5,5 mM K_2SO_4 , 3,3 mM CaSO_4 , 1,1 mM MgSO_4 , 32,4 mM Tris- SO_4 , 1,0 mM Na-Phosphat-Puffer.

Zusammensetzung des Gluconat-Puffers: 107,3 mM Na-Gluconat, 7,8 mM K-Gluconat, 3,3 mM Ca-Gluconat, 1,1 mM Mg-Gluconat, 32,4 mM Tris-Gluconat.

2.2.1.4 Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,4

Der pH-Wert wurde über eine Einstabmeßkette (Schott N6000A, Orion digital ionanalyzer 501) bei Raumtemperatur eingestellt.

Zusammensetzung: 90 mM NaCl, 9 mM KH_2PO_4 , 34 mM Na_2HPO_4

2.2.2 Inkubationslösungen

Jeweils am Versuchstag wurde die Inkubationslösung aus den Versuchspuffern (2.2.1.) und frisch gelöster Glukose- und Mannitlösung angesetzt. Der so erhaltene Inkubationspuffer entsprach in seiner Zusammensetzung der im Versuch eingesetzten Gegenlösung. Substrat, Marker und Inhibitoren wurden in einem Rotationsverdampfer (Büchi) unter Vakuum in Spitzkölbcchen eingeengt und als dünner Substanzfilm von der Spitzkolbenwandung mit dem Inkubationspuffer aufgenommen. Alle radioaktive Substanz enthaltenden Inkubationslösungen wurden direkt vor Versuchsbeginn einer Szintillationszählung unterzogen, um damit die vollständige Lösung des Substrates von der Wandung zu kontrollieren. Die jeweils eingesetzte Menge an radioaktiver Substanz entsprach einer Aktivität von mindestens 1,3 μCi an ^3H und 0,3 μCi an ^{14}C per ml Inkubationslösung.

Um eine gleichbleibende Osmolarität des Inkubationsmediums sicherzustellen, wurde bei Lösungen mit Inhibitor- oder Substratkonzentrationen größer 0,1 mM eine entsprechende Menge an Mannit eingespart. Lag die einzusparende Menge an Inhibitor oder Substrat über der Mannitkonzentration von 14 mM, wurde zusätzlich ein Teil des NaCl im Puffer eingespart. Die in diesem Konzentrationsbereich

eingesetzten Substanzen waren in allen Fällen organische Säuren. Da diese Säuren als Natriumsalze eingesetzt wurden, ist durch die Verminderung des NaCl im Puffermedium ein Anteil der Chlorid-Anionen durch die organischen Anionen der Säure ersetzt worden.

Die Beziehung zwischen pH-Wert Änderungen des Inkubationspuffers und der Zufuhr saurer oder basischer Äquivalente wurde im Falle des Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffers, pH 7,00, experimentell über eine Titration des Puffers untersucht (Abb.1). Jeder Meßpunkt in der Abbildung entspricht dabei einer Einzelbestimmung, in der jeweils 1 ml Puffer mit 50 μ l einer HCl oder NaOH enthaltenden Lösung versetzt wurde. Der pH-Wert wurde dreimal über eine Blutgasmeßkette (Kapillarelektrode G297/G2, Digital pH Meter PHM52, Radiometer Copenhagen) bei 37°C bestimmt, der aufgetragene Wert entspricht dem einfachen Mittel dieser Bestimmungen. Den so ermit-

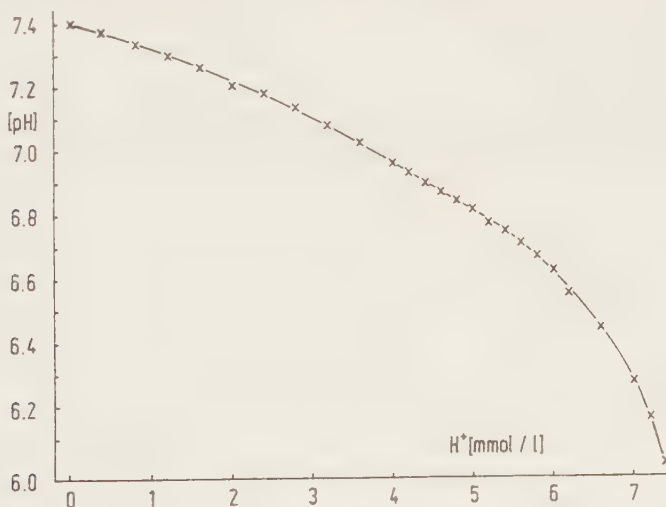


Abb.1 : Titrationskurve des Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffers, Abszisse: pH-Wert, Ordinate: zugegebene HCl in mmol per l, die mit aufgetragene Funktion entspricht dem errechneten Polynom dritter Ordnung, $1 \text{ mM H}^+ = 200 \text{ nmol H}^+ / \text{Mukosa}$
 $\text{H}^+ (\text{nmol/Mukosa}) = -182,5 \cdot x^3 + 2873 \cdot x^2 + -14887 \cdot x + 25999$
 $x = \Delta \text{pH}$

telten Meßwerten wurde ein Polynom dritter Ordnung angepaßt und über diese Funktion die pH-Änderungen in ein Äquivalent saurer oder basischer Einheiten übertragen.

Zusammensetzung des Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffers: 96,6 mM NaCl, 7,0 mM KCl, 3,0 mM CaCl₂, 1,0 mM MgSO₄, 29,4 mM Tris-HCl pH 7,4 20°C, 0,9 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,4 20°C, 14 mM Glukose, 14 mM Mannit.

Zusammensetzung des Krebs-Hepes-Glukose-Mannit Puffers: 98,5 mM NaCl, 7,2 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1,0 mM MgSO₄, 30,0 mM Hepes- HCl, 0,5 mM Na-Phosphat-Puffer, 14 mM Glukose, 14 mM Mannit.

Zusammensetzung des Krebs-Bistris-Glukose-Mannit Puffers: 98,5 mM NaCl, 7,2 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1,0 mM MgSO₄, 30,0 mM Bistris-HCl, 0,5 mM Na-Phosphat-Puffer, 14 mM Glukose, 14 mM Mannit.

Zusammensetzung des Tris-(Sulfat)-Glukose-Mannit Puffers: 69,0 mM Na₂SO₄, 5,0 mM K₂SO₄, 3,0 mM CaSO₄, 1,0 mM MgSO₄, 29,5 mM Tris-SO₄, 0,9 mM Na-Phosphat-Puffer, 14 mM Glukose, 14 mM Mannit.

Zusammensetzung des Tris-(Gluconat)-Glukose-Mannit Puffers: 97,5 mM Na-Gluconat, 7,1 mM K-Gluconat, 3,0 mM Ca-Gluconat, 1,0 mM Mg-Gluconat, 29,5 mM Tris-Gluconat, 14 mM Glukose, 14 mM Mannit.

Zusammensetzung des PBS-Glukose Puffers: 90 mM NaCl, 9 mM KH₂PO₄, 34 mM Na₂HPO₄, 14 mM Glukose.

Die im Versuch benötigte Glukosemenge wurde im Falle des PBS-Puffers in Abweichung vom oben geschilderten Verfahren direkt eingewogen.

2.3 Tiermaterial

In den Versuchen wurden Meerschweinchen männlichen Geschlechts mit einem Gewicht zwischen 300 und 600 g eingesetzt (Fa.Horner, Allendorf-Niederklein). Die Tiere wurden mindestens vier Wochen vor Versuchsbeginn im eigenen Tierstall gehalten. Gefüttert wurde in diesem Zeitraum mit einem standardisierten Mischfutter ('Spezialfutter für Meerschweinchen', Fa.Höveler, Langenfeld-Immingrath). Zu dieser Diät erhielten die Tiere 5mal wöchentlich 0,5ml eines Multivitaminsaftes (Multivitaminsaft, Lappe), der zusätzlich mit 20mg Ascorbinsäure per ml angereichert wurde. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Tiere nüchtern gesetzt, erhielten jedoch Wasser ad libitum.

2.4. Präparation der isolierten Mukosa

2.4.1 Meerschweinchenmukosa

Unter Einfluß einer leichten Äthernarkose wurden die Meerschweinchen gewogen und auf dem beheizten Operationsplatz fixiert. Nach Eintritt einer, durch weitere Ätherzufuhr eingetretenen, völligen Reflexfreiheit wurde der Bauchraum der Tiere median geöffnet und der gewünschte Darmabschnitt aufgesucht. Zur Präparation des Jejunums wurde Darmmaterial ab 15 cm kaudal des Pylorus in distaler Richtung, zur Präparation des Colons Material ab 2 cm kaudal des Caecums in Richtung des Rektums entnommen.

Vor Entnahme einzelner Teile wurde der gesamte in Frage kommende Darmabschnitt am oberen und unteren Endpunkt der Präparation angeschnitten und schonend mit auf 37°C erwärmtem Krebs-Tris Medium durchgespült. Nach Abklemmen der Blutversorgung wurden nun 1,5-2 cm lange Darmstücke entnommen, auf einem angefeuchteten Glasstab aufgezogen und noch anhaftende Gefäße und Bindegewebe vorsichtig entfernt. Das Darmstück wurde entlang des Mesenteriums aufgetrennt und mit der serosalen Seite nach unten auf eine geätzte Glasplatte verbracht. Das vom Präparator entfernt liegende

Ende des Darmstückes wurde durch einen Objektträger fixiert und die Mukosa mit einer im spitzen Winkel aufgesetzten Rasierklinge zum Präparator hin abgezogen. Die isolierte Mukosa wurde in einem auf 37°C erwärmten Krebs-Tris Puffer flottiert und von dort auf einen 17mm breiten Plastikspatel aufgespreitet. Von hier wurde das Epithel mit einem Stück Nylongaze (Nylon Monofilm 32-S, Schweizerische Seidengaze Fabrik AG, Zürich, Schweiz) aufgenommen (Lumen-seite nach oben) und mit einer Handlupe bei 10facher Vergrößerung einer kurzen Sichtkontrolle auf Undichtigkeiten und richtiger Orientierung unterzogen.

Entsprechend diesem Befund wurde das Präparat in kleinere Einheiten von ca. 1 cm² zerteilt und diese Stücke auf die Fensterfläche der PVC-Folie gelegt. Nach Abdecken mit einer zweiten Folie und kurzer Sichtkontrolle der räumlichen Lage des Präparates wurde nun die Kammer geschlossen und mit einer Schlauchklemme fixiert. Nach Zugabe der Inkubationslösung und Anschluß der Begasung konnte nun die Inkubation der Versuchskammer beginnen. Der Zeitraum zwischen Abklemmen der Blutversorgung und Beginn der Inkubation betrug immer weniger als drei Minuten.

Von einem dem Tier entnommenen Darmstück konnten in der Regel vier Präparate für Einzelkammern gewonnen werden. Für die Präparate eines Versuches mit 24 Einzelkammern konnten die benötigten Mukosastücke in fast allen Fällen von einem Tier gewonnen werden.

2.4.2. Humanmukosa

Für die Versuche an humanem Mukosamaterial wurde Operationsmaterial von Patienten männlichen und weiblichen Geschlechts verwendet. Darmabschnitte des Duodenums und des proximalen Jejunums wurden unter dem Begriff Dünndarm, Darmabschnitte des Colon transversum, des Colon descendens und des Colon sigmoideum unter dem Begriff Dickdarm zusammengefasst. Die Diagnose der Patienten lautete auf ein Carcinom der Bauchspeicheldrüse (Pankreaskopftumor) bei den Präparaten des Dünndarms und auf ein Carcinom des Colons

bei den Präparaten des Dickdarms. Für unsere Untersuchungen wurde nur nicht carcinomatöses Gewebe verwendet.

Nach Entnahme des Darmmaterials in der Klinik wurde das Gewebe sofort in eiskalte physiologische Kochsalzlösung gelegt und in das Institut transportiert. Da parallel zum Abholen des Materials eine zweite Gruppe im Institut den Versuch vorbereitete, konnte in allen Fällen unverzüglich mit der Präparation des Gewebes für den Kammerversuch begonnen werden. Das Gewebe wurde aus dem Puffer auf einen gekühlten Präparationsplatz verbracht und von Fett, Bindegewebe, Gefäßen und dem größten Teil der Tunica muscularis befreit. Anschließend wurde es mit der Mukosa nach oben auf eine geätzte Glasplatte gelegt und mit einer Rasierklinge wie bei 2.4.1 abgezogen. In den Fällen, in denen sich das Material nicht auf diese Weise präparieren ließ, wurde die Muskelschicht durch vorsichtiges Abschaben von der serosalen Seite her entfernt. Der weitere Verlauf des Versuches entsprach Kapitel 2.4.1.

2.5. Kammermethodik und Inkubationsverlauf

2.5.1 Regelfall

Eine ausführliche Beschreibung der Methode der isolierten Mukosa findet sich bei Lauterbach (1971,1977). Der Inkubationsverlauf stellte sich in der Regel wie folgt dar:

Das isolierte Mukosapräparat bildete im Versuch eine Trennwand zwischen zwei Flußkammerhälften. Die genaue Beschreibung der Lage der Komponenten dieser Flußkammer entspricht Abb.2. Entsprechend der Orientierung des Gewebes wird die der luminalen Seite der Mukosa zugewandte Hälfte als lumenseitiger (L), die der serosalen Seite zugewandte Hälfte als blutseitiger (B) Raum bezeichnet. Die Seite des Substratangebotes wird als Angebotsseite (AS), die Seite ohne Substrat als Gegenseite (GS) bezeichnet.

Gefüllt wurden beide Kammerhälften durch Bohrungen in der Kammerwandung, welche sich durch eine Stichbohrung zum tiefsten Punkt des Kammerbodens öffnen. An ihrem oberen Ende haben die Bohrungen zwei konische Erweiterungen, deren Form ein genaues Einpassen der Koni der Füll- und Entleerungspipetten (Mikropipetten Eppendorf) und der Rekordspitzen der Begasungsapparatur erlaubte. Die Begasung der Kammern erfolgte beidseitig mit wasserdampfgesättigtem und auf die Inkubationstemperatur erwärmten Sauerstoff oder Stickstoff.

Das Füllvolumen betrug auf beiden Seiten der Kammer jeweils 200 μ l. In den Versuchen zur Permeation wurde der Angebotslösung als Markersubstanz des extrazellulären Raumes der Mukosa und der parazellulären Permeabilität des Gewebes ^3H -PEG 900 zugegeben. Die Inkubation der Versuchskammern erfolgte bei 7 oder 37°C in einem thermostatierten Wasserbad über einen Zeitraum von in der Regel 45 Minuten. Nach Ablauf der Inkubationsperiode wurde die blut- und lumenseitige Inkubationslösung mit Mikropipetten der Firma Eppendorf abgezogen und in Reaktionsgefäße nach Eppendorf

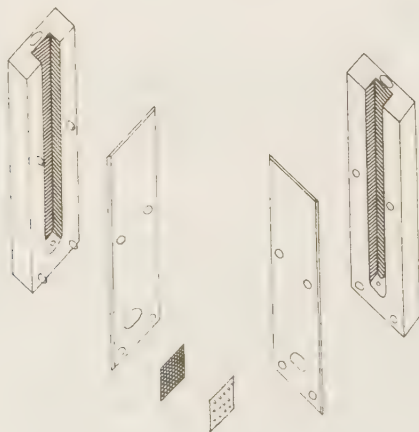


Abb 2. : Flußkammer nach Lauterbach. Komponenten von außen nach innen: Flußkammerhälften mit Bohrungen, PVC-Folien, Mukosapreparat und Gaze, Fensteröffnung der PVC-Folie: 0,2 cm² (Lauterbach, 1977)

überführt. Das Gewebe wurde mit beiden PVC-Folien der Kammer entnommen und die Mukosa aus der Fensteröffnung ausgestanzt. Das so erhaltene Gewebestück und die darunterliegende Gaze wurde in vorgewogene Reaktionsgefäße nach Eppendorf überführt und diese gewogen. Die Differenz beider Wägungen ergab die Summe des Feuchtgewichtes der Mukosae und der mitausgestanzten Gaze.

2.5.2 Versuche mit einer Vorinkubation des Gewebes

In den Versuchen zur hyperosmolaren Schädigung der Mukosae, Versuchen mit Inhibitorzugabe und den Versuchen an der isolierten Humanmukosa erwies sich eine Vorinkubation der Kammern als sinnvoll. Im Falle der hyperosmolaren Schädigung des Meerschweinchen-Jejunums wurden die Mukosae lumenseitig mit der hyperosmolaren Lösung und blutseitig mit normotonem Krebs-Tris-Glucose-Mannit Medium über einen Zeitraum von 30 Minuten vorinkubiert. Nach Absaugen der Vorinkubationslösung wurden die Versuchskammern zweimal beidseitig mit je einem ml normotonen Krebs-Tris-Glucose-Mannit Medium gespült. Die Inkubationslösungen im Versuch waren sowohl auf der Lumen- wie der Blutseite normotone Lösungen. Der weitere Inkubationsverlauf entsprach dem im vorangegangenen Text beschriebenen Regelfall.

Im Falle der Versuche mit einem in der Versuchslösung enthaltenem Inhibitor - Phenoxybenzamin oder Acetazolamid - entfiel der Spülvorgang, da der Inhibitor sowohl im Vorinkubations- wie Inkubationsmedium enthalten war. Acetazolamid wurde zum Erreichen eines genügend hohen Gewebespiegels 20 Minuten vorinkubiert. Die Phenoxybenzamin enthaltende Vorinkubationslösung mußte aufgrund der geringen Stabilität dieser Verbindung während der zweistündigen Vorinkubationsperiode alle 20 Minuten gegen frisch angesetzte Lösung ausgetauscht werden. In allen Versuchen mit Vorinkubation wurden zur Kontrolle Versuchskammern mit dem gleichen Wechsel der Inkubationslösungen, jedoch ohne Inhibitor, mitgeführt.

Bei der Inkubation der Humanmukosa wurden die Versuchskammern prinzipiell 20 Minuten bei 37°C mit Krebs-Tris-Glucose-Mannit Medium vorinkubiert. Nach Ablauf der Vorinkubation wurde das Substrat 11fach konzentriert in 20 µl des Versuchspuffers der jeweiligen Angebotsseite zugegeben. Gleichzeitig wurde zu der entsprechenden Gegenlösung 20 µl des Inkubationspuffers hinzugefügt. Das Endvolumen der Inkubationslösungen entsprach damit 220 µl. Die weitere Inkubation entsprach dem Regelfall.

2.5.3 Effluxversuche

In den Versuchen zum Efflux lumen- oder blutseitig mit ^{14}C -PABA vorbeladenen Mukosae wurde ein modifiziertes Kammermodell eingesetzt. Neben der im vorangegangenen Text beschriebenen Bohrung zum Füllen und Begasen der Kammerhälften, besitzt dieses Modell der Versuchskammer eine zweite Bohrung, die ebenfalls am tiefsten Kammerinnenpunkt endet. Anstelle des Doppelkonus ist am oberen Ende dieser Bohrung eine Stahlkapillare eingesetzt.

Der Versuchsablauf stellte sich im Einzelnen bei den Effluxexperimenten am Meerschweinchen-Jejunum wie folgt dar:

Nach der, wie im Regelfall verlaufenen, 45 minütigen Vorinkubation mit lumen- oder blutseitig eingesetztem Substrat wurden beide Kammerhälften über ein schwaches Vakuum durch die Stahlkapillaren in Reaktionsgefäße nach Eppendorf entleert. Das als Effluxpuffer eingesetzte Krebs-Tris-Glukose-Mannit Medium wurde nun in beide Kammerhälften gegeben und diese Lösungen nach Ablauf eines bestimmten Zeitraumes ebenfalls über die Kapillaren in frische Reaktionsgefäße nach Eppendorf abgesaugt. Dieser Ablauf wurde mehrfach wiederholt und so der Efflux des Tracers zum Zeitpunkt von 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 und 120 Minuten nach Ende der Vorbeladungsperiode bestimmt.

Ein Nachteil dieser Methode war der große, im Kammervolumen verbliebene Anteil an PABA, der sich überwiegend in die frühen Effluxlösungen der jeweiligen Angebotsseite auswaschen ließ. Aus

diesem Grunde wurde in den Effluxversuchen am Meerschweinchen-Colon die Mukosa ohne Gaze direkt in die Fensteröffnung einer PVC-Folie eingeklebt (Gewebekleber Histoacryl[®] blau, B.Braun Melsungen, Melsungen). Nach Vorinkubation wurde die Folie mit der Mukosa aus der Kammer genommen und durch kurzes Eintauchen in eiskaltem Krebs-Tris Medium das anhaftende PABA entfernt. Das Präparat wurde nun in eine frische Kammer verbracht. Der weitere Versuchsverlauf entsprach bis auf die geänderten Effluxzeiten von t= 5, 10, 20, 30, 45, und 60 min dem am Jejunum.

2.5.4 Influxversuche

In den Versuchen zum Influx von ^{14}C -PABA in die isolierte Mukosa des Meerschweinchen-Colons wurde ebenfalls der modifizierte Versuchskammertyp (s.a.2.5.3) eingesetzt. Der Versuchsablauf gestaltete sich wie folgt:

Alle Versuchskammern wurden vor der Influxperiode 20-30 min mit Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer vorinkubiert. In der Vorinkubation sollte eine Equilibrierung des Kammerystems auf die Inkubationstemperatur von 37°C und eine optimale Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Glukose sichergestellt werden. Darüberhinaus erwies sich in Vorversuchen eine Vorinkubationsperiode, in der alle im Versuch eingesetzten Versuchskammern präpariert wurden, auch aus technischen Gründen als günstig. Nach der Vorinkubation wurde die Inkubationslösung über zwei in einer Halterung fixierte Stahlkapillaren mit einem starken Vakuum abgesaugt. Die auf 37°C vorgewärmte Inkubationslösung wurde sofort zugegeben; zwischen Entleeren und Füllen der Kammer lag ein Zeitraum von weniger als 3 Sekunden. Die Inkubation wurde durch Absaugen der Versuchslösung in Reaktionsgefäße nach Eppendorf über die in der Kammerwandung eingelassenen Stahlkapillaren beendet und beide Flußkammerhälften sofort mit je einem ml eiskaltem Krebs-Tris Puffer gespült. Nach weiteren 10 Sekunden wurde die Spülflüssigkeit analog zur Vorinkubationslösung entfernt, die PVC-Folien mit der Mukosa der Kammer entnommen und das Gewebe ausgestanzt. Mit

diesem Verfahren ließen sich problemlos Inkubationszeiten von 15 Sekunden erzielen, in der Regel wurde eine Minute inkubiert. Je nach Inkubationszeit konnten in einem Influxversuch bis zu 18 Versuchskammern inkubiert werden.

2.6. Probenaufbereitung

Nach Pipettieren eines Aliquots von 50-100 μ l der Inkubationslösungen zur Szintillationszählung wurden die Proben in allen Fällen bis zum Zeitpunkt einer weiteren Aufbereitung bei -18°C aufbewahrt.

In den Versuchen zur Metabolisierung und zur Metabolitenverteilung von PABA, Ac-PABA und AAP wurden die Mukosae sofort nach Ausstanzen rückgewogen und mit 200 μ l 50%iger methanolischer Lösung (v/v) überschichtet. Nach Versuchsende wurden die Mukosastücke in dieser Lösung zerstampft und anschließend 24h bei Raumtemperatur extrahiert. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Fa. Eppendorf) wurde der Überstand aufgenommen und ein Aliquot von 50 μ l der Szintillationszählung zugeführt. Der verbliebene Extrakt wurde bis zu seiner weiteren Aufbereitung bei -18°C aufbewahrt. In Vorversuchen wurde der Mukosarückstand nach der Zentrifugation mit Soluene (Fa. Packard) aufgelöst und die im Gewebe verbliebene Aktivität bestimmt. Diese Versuche ergaben eine vollständige Extraktion des PABA und des Ac-PABA.

In den Versuchen zum Permeationsmechanismus ohne anschließende chromatographische Auftrennung der Versuchsinkubate wurden zum Auswiegen der Mukosae Reaktionsgefäße nach Eppendorf mit kleinen Aluminiumschiffchen verwendet. Die Mukosae konnten so ohne Berührung des Gefäßes nach dem Auswiegen mitsamt der Aluminiumfolie in ein Gefäß zur Szintillationszählung (Fa. Zinser) verbracht und hier 24h in 200 μ l einer 50%igen methanolischen Lösung (v/v) extrahiert werden.

2.7. Bestimmungsmethoden

2.7.1 Szintillationszählung

In allen Versuchen wurden Aliquots der Versuchsinkubate und der frischen Angebotslösung in einem Volumen von 50-100 μ l über Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt. Die den radioaktiven Tracer enthaltenden Proben wurden mit A.dest. auf je 200 μ l aufgefüllt und mit je 9 ml Szintillationslösung nach Bray (1960) versetzt. Ebenso wurde mit den Extrakten der Mukosae der Metabolisierungsversuche verfahren. Die Mukosae der Permeationsversuche wurden nach der Extraktion mit 9 ml Szintillator (Bray, 1960) aufgefüllt. Die Bestimmungen erfolgten in Flüssigkeitsszintillationszählern der Firma Packard (Tri-Carb 3380) und der Firma Berthold (Betazint BF5000).

2.7.2 Dünnschichtchromatographische Methoden

Alle radioaktiv markierten Verbindungen wurden vor ihrem ersten Einsatz über dünnschichtchromatographische Methoden auf Verunreinigungen überprüft. In den Untersuchungen zum Metabolismus von PABA und Ac-PABA wurden Aliquots von je 10 μ l der frischen Angebotslösung und der Versuchsinkubate der Angebotsseiten, Aliquots von je 50 μ l der Versuchsinkubate der Gegenseiten und der Extrakte der Mukosae einer dünnschichtchromatographischen Trennung unterzogen.

PABA und seine Metaboliten wurden in der Regel auf Kieselgel (60 F254 Glasplatten mit Fluoreszenzindikator, Firma Merck, Darmstadt) aufgetrennt. Die Platten wurden 10 Minuten bei 110°C aktiviert, die Auftragung der Proben erfolgte mit einem kalten Föhn. Alle Trennungen erfolgten bei Raumtemperatur in Trennkammern der Firma Desaga, Heidelberg (22cm l x 10cm b x 21cm h).

Als Laufmittel wurde zur Entwicklung der Chromatogramme ein System nach Gillio-Tos und Mitarbeitern (1964, Laufmittel I, Tab.1) eingesetzt. Um die Identifikation des Metaboliten Ac-PABA abzusich-

ern, wurde in einem Fall ein Inkubat einer Angebotsseite in zwei weiteren Systemen (Laufmittel II u.III, Tab.1) aufgetrennt.

Tab.1: Laufmittel der Dünnschichtchromatographie von PABA

I Diäthyläther/ Äthylacetat / Essigsäure	10 / 10 / 1	(v/v/v)
II Äthanol / Äthylacetat / Essigsäure	10 / 10 / 1	(v/v/v)
III Methanol / Aceton / Essigsäure	10 / 10 / 1	(v/v/v)

Die entwickelten Chromatogramme wurden radiodünnschichtchromatographisch über Dünnschichtscanner der Firma Berthold (LB 2723 mit Berthold Dual-Ratemeter-Integrator LB 242K und Zweikanalschreiber der Fa. Siemens oder LB 2842 mit Apple IIe Mikrocomputer und Epson RX80 Matrixdrucker) ausgewertet. Die UV-absorbierenden Substanzen wurden mit einer UV-Lampe der Firma Desaga (Minuvis) bei 254 nm detektiert.

Obwohl in allen Fällen in Laufmittel I eine befriedigende Trennung von PABA und seinen Metaboliten erzielt werden konnte, erwiesen sich die erzielten Rf-Werte als nicht konstant. Der für PABA ermittelte Rf-Wert schwankte zwischen 0,6 und 0,8, der für Ac-PABA ermittelte Wert zwischen 0,45 und 0,58. Aus diesem Grunde wurde in allen Chromatogrammen auf jeder Bahn eine für die UV-Detektion ausreichende Menge von je 10^{-8} mol an inaktivem PABA und Ac-PABA mitgeführt. Die als weitere Referenzsubstanzen zum Teil mitgeführten Verbindungen PAH und Ac-PAH erzielten Rf-Werte von 0,21-0,23 resp. 0,07-0,08.

Die freie Aminogruppe des PABA konnte über eine Azokuppelung mit 1-Naphthol (Bratton und Marshall, 1939) nachgewiesen werden. Nach Aufsprühen von Natriumnitrit (1% in 1N HCl, Reagenz 1) wurde nach einer Minute 1-Naphthol (0,2% in 1N KOH, Reagenz 2) aufgetragen. Die Entwicklung der gelben Flecken an der Stelle des PABA erfolgte bei 60°C innerhalb von fünf Minuten. Ac-PABA ließ sich auf diese Weise aufgrund seiner acetylierten Aminogruppe nicht nachweisen. Nach 60 minütiger saurer Hydrolyse mit 1N HCl bei 100°C (HCl zu Beginn, bei 20 und 40 min aufgesprüht) konnte das auf diesem Wege

zu PABA umgesetzte Ac-PABA ebenfalls auf der Platte mit den Sprühreagenzien nachgewiesen werden.

Salicylsäure wurde auf Kieselgel (60 F524 Aluminiumplatten mit Fluoreszenzindikator, Fa. Merck, Darmstadt) in einem Laufmittel aus Isopropanol / Ammoniumhydroxid (30%) / Wasser (40/2/4, v/v/v) aufgetrennt ($R_f=0,42$). Sulfanilsäure (1) und β -Naphtholorange (2) wurden auf Kieselgel (60 F524 Glasplatten mit Fluoreszenzindikator, Firma Machery Nagel) in einem Laufmittel aus Äthanol / Chloroform / Wasser (60/30/20, v/v/v) aufgetrennt ($R_{f1}=0,42$, $R_{f2}=0,60$). β -Naphtholorange wurde über seine Eigenfärbung, Salicylsäure und Sulfanilsäure mit einer UV-Lampe der Firma Desaga (Minuvis) bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert.

2.7.3 HPLC-Methodik

Aminoacetophenon (AAP) und Acetaminoacetophenon (Ac-AAP) wurden mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie bestimmt. Zur eingesetzten Anlage gehörte neben der Säule ein Injektor mit einer Dosierschleife von 50 μ l (Rheodyne 7125), eine Doppelkopf-Kolbenpumpe (LKB 2150 HPLC Pump) und ein UV-Monitor (LKB 2151 Variable Wavelength Monitor) mit angeschlossenem Rechner-Integrator (Spectra Physics SP4100).

Als Säulenmaterial wurde eine 20 cm lange reversed-phase Säule mit Octylsilan als stationärer Phase (LiChrosorb RP-8, Merck) eingesetzt. Die mittlere Teilchengröße des Trägermaterials betrug 5 μ m. Zum Schutz der Säule wurde der Trennsäule eine Vorsäule von 2 cm Länge, gefüllt mit gebundenem Octylsilan mit einer Korngröße von 40 μ m, vorgeschaltet. Die Auftrennung erfolgte bei Raumtemperatur, der mittlere Säulendruck überstieg in keinem Fall 100 bar. Die Bestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von 297 nm.

Injiziert wurde mit einer Hamiltonspritze (7100S, Latek) ein Volumen von je 80 μ l. Die Differenz von 30 μ l zum Füllvolumen der Injektorschleife diente zum Spülen der Kapillare. Zwischen den Läu-

fen wurde die Dosierschlaufe mit einem ml A.dest. durchgespült. Vor dem Auftragen wurden alle Inkubationslösungen und Mukosaextrakte 15 min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert.

Eine optimale Auftrennung von AAP und Ac-AAP konnte mit einem Laufmittel aus Wasser, Acetonitril und Methanol 75 / 15 / 10 (v/v/v) erzielt werden. Die Retentionszeiten lagen bei einer Flußrate des Laufmittels von 1,5 ml pro min für AAP bei 6,10 +/- 0,02 min; N=64 und für Ac-AAP bei 8,66 +/- 0,03 min; N=69.

2.7.4 Kolorimetrische Bestimmung von PABA

PABA wurde in einem Versuch am Meerschweinchen-Colon nicht über seine radioaktive Markierung, sondern über eine Azokuppelung seiner freien Aminogruppe bestimmt (Bratton und Marshall, 1939). Die Aufarbeitung der Proben und das verwendete Testsystem folgten dabei einer Beschreibung von Gharbo und Mitarbeitern (1985) zur Bestimmung kleiner Mengen an PABA im Plasma.

Als Reagenzien wurden dabei eingesetzt:

Perchlorsäure 70,0 %

Natriumnitrit 0,1 % in 10% HCl

Ammoniumamidosulfonat 0,5 % in A.dest.

N-Naphthyl-1-äthylendiammoniumdichlorid (NEDA) 0,1 % in A.dest.

Die Natriumnitritlösung wurde an jedem Versuchstag frisch bereitet. Die Ammoniumamidosulfonatlösung und das NEDA-Reagenz sind nach Angaben von Gharbo und Mitarbeitern (1985) 3-5 Tage unter Kühlung stabil.

Zu 200 µl der Probe wurden zur Enteiweißung und sauren Hydrolyse des Ac-PABA 40 µl Perchlorsäure 70% zugegeben. Der Überstand wurde nach 5 minütiger Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) dekantiert und eine Stunde bei 100°C hydrolysiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden nun 40 µl 0,1% Natriumnitrit

zugegeben und das Reaktionsgemisch auf einem Vortex (Bender Hobein AG) durchmischt. Nach 4 Minuten wurden 40 μ l 0,5% Ammoniumamidosulfonat zugegeben und der Ansatz wieder durchmischt. Nach weiteren 4 Minuten wurden 40 μ l 0,1% NEDA zugegeben, der Ansatz durchmischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion der Proben wurde in Mikroküvetten (C 81 S, OS, 1cm Lichtweg, Helma) in einem Zweistrahlphotometer (Unicam SP1800) gegen einen Leerwert bestimmt.

Ein Problem bei der Bestimmung des PABA war in diesem Versuch das in gleicher Lösung eingesetzte β -Naphtholorange. Die eingesetzte Konzentration an PABA lag bei 2 mM, die des β -Naphtholorange bei 10 μ M. Um einen Fehler in der Bestimmung des PABA durch die Extinktion des β -Naphtholorange zu vermeiden, wurde ein Spektrum beider Azo-Verbindungen aufgenommen (Abb.3). Als Extinktionsmaxi-

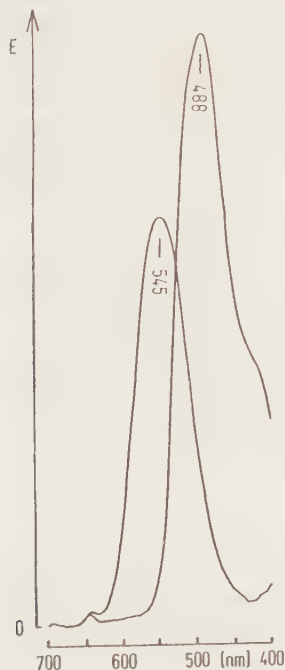


Abb.3 : Extinktionsspektrum von β -Naphtholorange (488 nm) und Azotierungsprodukt der p-Aminobenzoesäure (545 nm)

man konnte für die umgesetzte p-Aminobenzoesäure 545 nm, für β -Naphtholorange 488 nm bestimmt werden. Gemessen wurden die Proben dann bei 548 nm, wobei die Extinktion des β -Naphtholorange nur 3,1% ihres Maximalwertes betrug. Der durch diese Extinktion bedingte Fehler in der Bestimmung von PABA war im ungünstigsten Fall (Gegenseiten nach blutseitigem Angebot) kleiner 1% der gemessenen Konzentration. Die in diesem Fall bestimmte Konzentration lag bei 0,692% der zu Versuchsbeginn eingesetzten Menge an PABA, so daß sich der Fehler von einem Prozent mit 0,007% der eingesetzten Menge an PABA bemerkbar machte. In den Lösungen der Angebotsseiten und der Gegenseiten nach lumenseitigem Angebot war der durch β -Naphtholorange bedingte Fehler kleiner 0,1% des zu bestimmenden Wertes. Aufgrund dieser geringen Differenzen wurde auf eine Korrektur der gemessenen Extinktionen auf die durch β -Naphtholorange bedingte Extinktion verzichtet.

Zur Eichung der Bestimmung wurde eine Eichkurve mit PABA in einer Konzentration zwischen 0,5 und 50 μ M aufgenommen. Diese Eichkurve erwies sich als linear zwischen 0,5 und 20 μ M, änderte ab diesem Wert ihre Steigung und war zwischen 20 und 50 μ M wiederum linear. Da PABA im Versuch in einer Konzentration von 2 mM eingesetzt wurde, war eine Verdünnung der Proben vor Einsatz im Testsystem erforderlich. Die Inkubate der Angebotslösungen wurden 1:100, die der Gegenseiten nach lumenseitigem Angebot 1:20 und die der Gegenseiten nach blutseitigem Angebot 1:4 verdünnt. Die bestimmten Extinktionsdifferenzen lagen in einem Bereich zwischen 0,1 und 0,7, die daraus zu bestimmende Konzentration der Verdünnungen zwischen 4 und 29 μ M. Die Konzentration der nicht im Versuch eingesetzten Angebotslösung konnte mit 1,995 mM mit einem Fehler von 0,25% bestimmt werden.

2.7.5. Bestimmung des pH-Wertes der Inkubationslösungen

In einigen Versuchen am Meerschweinchen-Jejunum und Colon wurden die pH-Werte der Versuchsinkubate und ihr Einfluß auf die Permeationsraten untersucht. Zu diesem Zweck mußten sehr kleine Volumina der Inkubationslösung einer Messung zugänglich gemacht werden. Zusätzlich sollten wegen der ausgeprägten Temperaturabhängigkeit der pH-Werte des Tris-Puffers (Good und Mitarbeiter, 1966) alle Bestimmungen bei 37°C erfolgen.

Alle diese Bedingungen werden von einer Blutgasmeßkette (Kapillarelektrode G297/G2, Digital pH Meter PHM52, Radiometer Copenhagen) erfüllt. Das Meßvolumen beträgt nur 30-40 µl und die Elektrode befindet sich während der Messung in einem thermostatiertem Wassertank. Vorversuche ergaben keine Differenz der pH-Werte zwischen direkt nach den Versuchen gemessenen Proben und zeitlich eingefrorenem Probenmaterial. Alle Proben wurden nach dem Auftauen vor Einbringen in die Kapillare zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge). Die Kapillare wurde zwischen den Einzelmessungen mit A.dest. 15 s gespült und weitere 15 s mit durchgezogener Luft getrocknet. Das Messsystem wurde jeweils nach 12 Messungen mit Eichpuffer überprüft und bei einer Abweichung neu geeicht.

2.8. Bestimmung der Verteilungskoeffizienten

In einem Versuch wurden die Verteilungskoeffizienten der Sulfanilsäure, der Salicylsäure, der p-Aminobenzoesäure, der Acetyl-p-aminobenzoesäure und des β-Naphtholorange bestimmt. Als organische Phase wurde iso-Butanol gewählt. Als wässrige Phase wurde eine Citrat-HCl Lösung mit einem pH-Wert von 2 gewählt; bei diesem pH-Wert lagen alle Verbindungen fast vollständig als freie Säuren vor.

Alle Verbindungen wurden in einer Endkonzentration von 10 µM in der wässrigen Phase eingesetzt. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte über zugegebene radioaktiv markierte Substanz. Zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten wurden je 5 ml der wässrigen

Phase zu 5 ml der organischen Phase in einen Scheidetrichter gegeben und beide Phasen 2h geschüttelt. Nach dem Schütteln, bei dem beide Phasen in einer Emulsion vorlagen, wurde der Scheidetrichter bis zur vollständigen Trennung der Phasen ruhen gelassen.

Zur Bestimmung der Konzentration wurden je 100 μ l der organischen und der wässrigen Phase in ein Szintillationsgefäß gegeben. Um eine vergleichbare Zählausbeute zu erzielen, wurden der organischen Phase 100 μ l A.dest., der wässrigen Phase 100 μ l iso-Butanol zugegeben. Der weitere Meßvorgang erfolgte wie bei 2.7.1.. Alle Proben wurden dreifach bestimmt und der Verteilungskoeffizient aus dem Verhältnis der Konzentrationen in der organischen und in der wässrigen Phase errechnet.

2.9. In vivo Perfusionstechnik

In vivo Perfusionsexperimente wurden am Jejunum des Meerschweinchens, dem Colon des Meerschweinchens und dem Colon der Ratte durchgeführt. Die Perfusionsapparatur bestand aus einer Schlauch-peristaltikpumpe (Crouzet 82-344) und einem wasserthermostatiertem Vorratsgefäß der Inkubationslösung mit einem Volumen von 10 ml. Das Perfusat wurde aus dem unteren Auslaß des Vorratsgefäßes über die Pumpe zu einem wasserthermostatierten Gegenstrom-Wärmetauscher geführt. Am Auslaß des Wärmetauscher befand sich nach einem kurzen Schlauchstück eine Plastikolive, in die der Darm eingebunden wurde. Am distalen Ende des Darmabschnittes wurde ein zweiter Schlauch auf die gleiche Weise eingebunden und die Lösung so zum Vorratsgefäß zurückgeführt.

Die Versuchstiere wurden mit Urethan i.p. narkotisiert (1,5-2,2 g/kg Meerschweinchen, 1,1g/kg Ratte). Nach Eintritt der Reflex-freiheit wurde der Bauchraum der Tiere median eröffnet und der gewünschte Darmabschnitt aufgesucht. Das zur Perfusion vorgesehene Darmstück von 10-15 cm Länge wurde am oberen und unteren Ende angeschnitten und das Darmlumen 2 mal mit 10 ml Krebs-Tris Medium gespült. Der Puffer wurde möglichst vollständig aus dem Lumen ent-

fernt und die Oliven der Perfusionsapparatur eingebunden. Die freien Enden des Darmes wurden abgebunden und der Darm bis auf das zur Perfusion vorgesehene Darmstück wieder in den Bauchraum des Tieres verbracht. Die Perfusionslösung (6-10ml) wurde nun in das Vorratsgefäß eingefüllt und die Pumpe eingeschaltet. Bei Eintritt des Perfusates in den Darm wurde auf eine gleichmäßige und vollständige Füllung des Darmlumens geachtet. Während der gesamten Perfusionsdauer wurde das Darmstück mit Krebs-Tris Medium benetzt. Eine über das Darmstück gelegte dünne Plastikfolie verhinderte ebenfalls ein Austrocknen des Organes. Die Temperatur wurde über eine Glühlampe (50 Watt) auf 37°C eingestellt und über den Sensor eines elektronischen Fieberthermometers (Thermovit 4400, Atmos) kontrolliert.

Als Perfusionsbeginn wurde der Zeitpunkt des Austrittes der Perfusionslösung aus dem abführenden Schlauch in das Vorratsgefäß definiert. An dieser Stelle wurden vom Perfusionsbeginn bis -ende alle 10 oder alle 15 Minuten Proben in einem Volumen von 200 µl entnommen. Während in einem Versuch am Meerschweinchen-Jejunum und einem Versuch am Meerschweinchen-Colon die Perfusionslösung im Vorratsgefäß oxygeniert wurde, wurden in zwei weiteren Versuchen am Colon der Ratte und des Meerschweinchens die Perfusionslösung mit einem ml Paraffinöl überschichtet und anaerob gehalten. Der pH-Wert der Perfusionslösung wurde in den Versuchen am Colon über eine Einstab-Meßkette (Schott N6000A und Orion digital ionanalyser 501) über die ganze Perfusionsperiode im Vorratsgefäß (aerobe Inkubation) oder über eine Blutgasmeßkette (Kapillarelektrode G297/G2, Digital pH Meter PHM52, Radiometer Copenhagen) in den entnommenen Proben (anaerobe Inkubation) bestimmt.

Am Versuchsende wurde die im Vorratsgefäß vorhandene Lösung entnommen und die im Lumen verbliebene Lösung über ein Ausblasen des Darmes mit Luft ebenfalls entfernt. Der Darm wurde mit 20 ml eiskaltem Krebs-Tris Medium gespült und dem Tier entnommen. Die Mukosa wurde isoliert (s.a.2.4.1) und in ein vorgewogenes, eisgekühltes Homogenisierungsgefäß (Potter Homogenisator, B.Braun Melsungen) gegeben. Nach dem Rückwiegen wurde das Gewebe mit dem vier-

fassen seines Volumens (1g=1ml) 50%iger methanolischer Lösung (v/v) überschichtet und anschließend homogenisiert. Das Homogenat wurde nach einstündiger Extraktion auf Reaktionsgefäße nach Eppendorf verteilt und der Überstand in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Eppendorfgut) zentrifugiert. Parallel zur Entnahme des Darmes wurde das Herz der Tiere punktiert und auf diese Weise 3-6 ml Blut gewonnen. Das Blut wurde mit 1/10 seines Volumen einer 50 mM EDTA-Lösung versetzt, auf einem Vortex kurz durchmischt und anschließend in einer Kühlzentrifuge (Rotixa/KS, Hettich) bei 2°C bei 40000 rpm 15 min abzentrifugiert.

Nach dem Versuch wurden Anteile von 50-100 µl der Proben der Perfusionslösung, des Extraktes der Mukosa, des Plasmas und der Spüllösung auf 200 µl wässrige Phase aufgefüllt und der Szintillationszählung zugeführt. Um in den durch das freie Hämoglobin rot gefärbten Proben des Plasmas eine Verminderung der Zählausbeute zu vermeiden, wurden diese mit 10 µl Wasserstoffperoxid (32%) entfärbt. Vorversuche ergaben keinen Einfluß des Wasserstoffperoxids auf die Zählausbeute. Die Bestimmung erfolgte wie in Abschnitt 2.7.1 über Zugabe von 9 ml Szintillator nach Bray (1960). Aliquots von 20 µl der Perfusionslösung und 100 µl an entereweigtem Mukosaextrakt und Plasma wurden, wie in Abschnitt 2.7.2. geschildert, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt.

2.10. Berechnungen und Statistik

2.10.1. Berechnungen zur Methode der isolierten Mukosa

Die Konzentration der Substanzen in den Inkubaten der Angebots- und Gegenlösung wird in den Versuchen zur Permeation in Prozent der eingesetzten Aktivität, berechnet aus der frischen, nicht im Versuch eingesetzten Angebotslösung, angegeben. Aufgrund des großen Unterschiedes der Flußraten des Substrates nach lumen- oder blutseitigem Angebot wurde im allgemeinen auf eine Korrektur der Flußraten auf die extrazelluläre shunt-Permeabilität der Mukosae verzichtet. In den Fällen, in denen ein großer Teil der Permeation

extrazellulär über die shunts erfolgte, wird das Verhältnis von Marker- zur Substratpermeation graphisch mit einer Regressionsanalyse der Datenpaare dargestellt. Hilfreich bei einer Analyse der Substratpermeation ist auch das Verhältnis zwischen Marker- und Substratpermeation. Wenn sich dabei zwischen zwei Versuchsbedingungen sowohl Marker- wie Substratpermeation ändern, das Verhältnis zwischen beiden jedoch gleich bleibt, deutet dieser Befund auf eine rein passive Veränderung der Substratbewegung über die shunt-Permeabilität des Gewebes hin.

Die Menge der in der Mukosa bestimmten Verbindungen wird in Mikroliter-Äquivalenten der eingesetzten Angebotslösung berechnet. Das dabei für den Marker ermittelte Volumen entspricht dem extrazellulären Raum ($ER_{\mu l}$), der die an der Mukosa noch anhaftende Lösung der jeweiligen Angebotsseite repräsentiert. Unter der vereinfachten Annahme eines fast konstanten Verhältnisses von Substrat und Marker in der frischen und in der im Versuch eingesetzten Angebotslösung läßt sich das intrazelluläre Substrat als Differenz des Volumens des Markers und des Substrates in der Mukosa errechnen. Aus dem vom Marker eingenommenen Volumen und dem Feuchtgewicht der Mukosa läßt sich bei einem spezifischen Gewicht des Gewebes von $1\mu l = 1mg$ die Größe des extrazellulären Raumes in Prozent des Feuchtgewichtes ($ER\%$) ermitteln. Da die Markersubstanz in der jeweiligen Angebotslösung enthalten war und die auf der Gegenseite zu ermittelnde Markerkonzentration am Versuchsende vernachlässigbar gering ist, entspricht der ermittelte ER dem der jeweiligen Angebotsseite. Der Gesamt-ER entspricht der Summe dieser extrazellulären Räume. Mit diesem Wert wurde das Feuchtgewicht auf seinen intrazellulären Anteil korrigiert; diese Korrektur erfolgte für jede Versuchsbedingung mit dem jeweils experimentell ermittelten Extrazellulärräumen dieser Bedingung. Aus dem intrazellulären Substrat in μl und dem korrigierten Feuchtgewicht läßt sich nun eine intrazelluläre Konzentration in Prozent der frischen Angebotslösung bestimmen.

In den Versuchen zur Metabolisierung wird das oben geschilderte Verfahren der Berechnung modifiziert. Aus Gründen der Vergleich-

barkeit werden hier alle Versuchskammern auf 100% Gesamtausbeute normalisiert. Die Verteilung des Substrates zwischen Angebotsseite, Gegenseite und Mukosa errechnet sich aus dem Ergebnis der Szintillationszählung. Die Verteilung der gemessenen Aktivität in diesen Räumen auf Substrat und Metaboliten ergibt sich aus den Ergebnissen der radiodünnschichtchromatographischen Auftrennung von Aliquots dieser Lösungen. Da in den Untersuchungen zur Metabolisierung aus naheliegenden Gründen keine Markersubstanz mitgeführt werden konnte, wird der Anteil an Aktivität in der Mukosa wie bei der lumen- und blutseitigen Inkubationslösung auf die Gesamtmenge bezogen und in Prozent der eingesetzten Aktivität angegeben.

In den Versuchen zum Efflux von PABA aus einer vorbeladenen Mukosa wird die aus der Mukosa in die lumen- und blutseitige Inkubationslösung ausgetretene Menge an Aktivität getrennt für beide Seiten in Mikroliter-Äquivalenten der Angebotslösung berechnet. Geteilt durch den Zeitraum der jeweiligen Effluxperiode ergibt sich die Austrittsgeschwindigkeit des Substrates zur Lumen- und Blutseite in der Größenordnung $\mu\text{l per min}$. Trägt man die Austrittsgeschwindigkeit gegen die Zeit auf, so ergibt sich ein aus mehreren exponentiellen Funktionen zusammengesetzter Kurvenverlauf gemäß

$$f(x) = A_1 e^{K_1 t} + A_2 e^{K_2 t} + \dots A_n e^{K_n t}$$

Jede Teilfunktion entspricht dem Efflux der Aktivität aus einem bestimmten räumlichen Äquivalent des Kammer-systems oder der Mukosa. Berechnet wird die Gesamtfunktion über die Methode des exponentiellen Peelings (Rubinow, 1975). Diese Methode erlaubt, bei genügend Meßpunkten, die Berechnung multiexponentieller Funktionen, die aus beliebig vielen Einzelfunktionen zusammengesetzt sein können.

Ausgegangen wird von einer Anordnung der Teilfunktionen, in der $K_1 < K_2 < K_n$ ist. Da in einer Effluxfunktion K immer negativ ist, gilt $|K_1| > |K_2| > |K_n|$. In einer halblogarithmischen Auftragung von $\ln f(x)$ gegen t erhalten wir einen Kurvenverlauf, der für ein

großes t annähernd linear ist. In diesem Bereich wird der Kurvenverlauf überwiegend durch die letzte Teilfunktion gemäß

$$f(x) \sim A_n e^{K_n t}$$

bestimmt. Logarithmiert ergibt diese Funktion

$$\ln f(x) = \ln A_n + K_n t$$

Halblogarithmisch aufgetragen, errechnet sich somit K_n aus der Steigung und A_n aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse des analysierten Kurvenabschnittes. Ermittelt werden diese Konstanten über eine Regressionsrechnung nach der Methode der kleinsten Quadrate. Subtrahiert man nun die, sich aus den ermittelten Werten errechenbare, Teilfunktion von den experimentell ermittelten Gesamtdaten, so erhält man wiederum einen Kurvenverlauf, der für größere Zeiten annähernd linear ist. Diese Teilfunktion läßt sich, wie oben beschrieben, ebenfalls ermitteln. Das Verfahren wird solange fortgesetzt, bis die erhaltene Restfunktion annähernd linear ist und K_1 und A_1 aus dieser Geraden bestimmt werden kann.

In der auf diese Weise entwickelten Gesamtfunktion entspricht K_n dem Transferkoeffizienten des Kompartimentes n und A_n der Initialgeschwindigkeit zum Zeitpunkt t_0 . Die Halbwertszeit errechnet sich aus dem Transferkoeffizienten gemäß

$$t_{1/2} = \ln 2 / K_n$$

und das Gesamtvolumen der aus dem Kompartiment ausgetretenen Menge an Aktivität entspricht einem hypothetischen Volumen in μl der Angebotslösung entsprechend dem Integral der Effluxfunktion von

$$\int_{t_0}^{t_{\max}} f(x) = \frac{A}{K} * (e^{K t_{\max}} - 1)$$

wobei für $t_{\max}$ mit 120 min das Ende der Auswaschungsperiode angesetzt wird.

Die Berechnungen in den Versuchen zur Aufnahme von PABA folgen im Prinzip den Berechnungen der Permeationsversuche. Die aufgenommene Menge an PABA wird jedoch nach Korrektur auf das extrazelluläre

Substrat nicht als Konzentration, sondern als absolute Menge, bezogen auf die Oberfläche des Gewebes, in der Größenordnung $\mu\text{mol per min und cm}^2$ angegeben. Vorversuche ergaben keinerlei Beziehung zwischen der Größe des Feuchtgewichtes und der aufgenommenen Menge an PABA. Aufgrund des Spülvorganges am Inkubationsende nach Absaugen der Inkubationslösungen entspricht der in diesen Versuchen bestimmte ER nicht dem real vorhandenen und in den Permeationsversuchen bestimmten ER.

Die im Kurzzeitexperiment ermittelte Halbwertszeit der Anmarkierung des extrazellulären Raumes eröffnete die Möglichkeit der Abschätzung der Dicke der blutseitigen unstirred water layer (UWL). Der mittlere Radius eines PEG-Moleküls von 898 Dalton beträgt nach Sundquist und Magnusson (1985) 7,1 Angström. Der Diffusionskoeffizient D eines Moleküls in wässriger Lösung ermittelt sich aus dem Radius mit der 1905 von Einstein nach Stokes abgeleiteten Beziehung:

$$D = \frac{R * T}{n} * \frac{1}{6 * \pi * \xi * \varnothing}$$

mit R als Gaskonstante, n als Loschmidtsche Zahl, T als absolute Temperatur, ξ als Maß der Viskosität des Lösungsmittels und dem Radius $\varnothing$. Aus diesem Diffusionskoeffizienten und der Halbwertszeit der Anmarkierung des ER ergibt sich die Dicke der UWL nach Diamond (1966) gemäß:

$$d = \left| \frac{D * t_{1/2}}{0.38} \right|^{1/2}$$

2.10.2. "Passive" Parameter der Methode der isolierten Mukosa

Wie bereits in Abschnitt 2.5.1 beschrieben, wurden bei der Untersuchung des Permeationsmechanismus neben der Verteilung des Substrates auf Angebotsseite, Gegenseite und Mukosa ebenfalls die Verteilung einer Markersubstanz, PEG900, und das Feuchtgewicht der Mukosae bestimmt. Protokolliert wurde zusätzlich das verwendete

Darmstück distal des Präparationsbeginns (s.a.2.4.1) wie auch das Gewicht des Versuchstieres.

In einer Untersuchung dieser Parameter bietet sich als statistische Vergleichsbasis die Gruppe an, von der die meisten Versuchsdaten unter möglichst physiologischen Bedingungen vorliegen. Diese Gruppe wird im zu untersuchenden Datenmaterial von den mit Krebs-Tris-Glukose-Mannit Medium, pH 7,00 bei 37°C unter Sauerstoffbegasung inkubierten Versuchskammern repräsentiert. Eine Abhängigkeit zwischen den passiven Parametern und der im Versuch eingesetzten Verbindung (PABA und Ac-PABA am Jejunum, PABA, Ac-PABA, Salicylsäure, Sulfanilsäure und β -Naphtholorange am Colon) oder der Konzentration des eingesetzten Versuchssubstrates in einem Bereich zwischen 0,01 und 20 mM konnte in eingehenden Voruntersuchungen nicht belegt werden. Eine Auswertung der "passiven" Versuchsparameter findet sich jeweils in den Ergebnisteilen der Permeation am Jejunum und Colon. Ein Vergleich dieser Parameter bei geänderten Versuchsbedingungen wurde gegen Werte dieser Vergleichsgruppe geführt.

2.10.3. Statistische Methoden

Als mathematisches Hilfsgerät wurde zur Berechnung aller Versuchsdaten ein Kleincomputer HP85 der Firma Hewlett-Packard eingesetzt. Für die Berechnungen wurden Programme entwickelt, über die alle Versuchsdaten im Speichermedium abgelegt und bei einer weiteren Auswertung selektiv ausgelesen, statistisch bearbeitet, beliebig verändert und wiederum in das Medium eingelesen werden konnten.

Die Angabe der Mittelwerte erfolgt grundsätzlich immer mit dem Streuungsmaß des mittleren Fehlers des Mittelwertes (Standard Error of the Mean). Die Regressionsanalysen linearer und linearisierter Gleichungssysteme erfolgt über die Methode der kleinsten Quadrate (Snedecor und Cochran, 1967). Aus dem Regressionskoeffizienten der jeweiligen Funktion und der Anzahl

der Freiheitsgrade kann die Sicherheit der Korrelation zwischen den Wertepaaren direkt bestimmt werden (Noack, 1980).

Die Prüfung der Meßwerte auf Normalverteilung erfolgt für kleine Populationen nach der Methode der "Hazen'schen Geraden" (Noack, 1980) über die Sicherheit der Korrelation einer Geraden, gebildet aus der linearisierten Funktion der Erwartungswahrscheinlichkeit eines Meßpunktes gegen den Meßpunkt selbst. Größere Populationen wurden zum Teil einem Chi-Quadrat-Test auf Normalverteilung nach Sachs (1974) unterzogen. In keinem Fall erwiesen sich die Daten einer Versuchsbedingung als statistisch nachweisbar nicht normalverteilt.

Der statistische Vergleich zweier Versuchsgruppen erfolgte nach einer vorangegangenen Varianzanalyse (F-Test) bei einer Sicherheit von $< 95\%$ ungleicher Varianz nach der Methode von Student und bei einer Sicherheit von $> 95\%$ ungleicher Varianz nach der Methode von Welch (Noack, 1980). Die Beurteilung der Signifikanz folgte dem von Gottschalk und Kaiser (1972) vorgeschlagenem Beurteilungsschema, in dem, vereinfacht ausgedrückt, Werte einer Wahrscheinlichkeit $< 95\%$ als nicht signifikant (ns), Werte zwischen 95 und 99 % als schwach signifikant (*), Werte zwischen 99 und 99,9 % als signifikant (**) und Werte mit einer Wahrscheinlichkeit $> 99,9\%$ als hochsignifikant (***) voneinander verschieden betrachtet werden. Die Integration der in der Wahrscheinlichkeitsrechnung erhaltenen F- und TAU-Werte erfolgte über von Noack (1980) beschriebene Näherungsverfahren. Abweichungen zu tabellarischen Werten für die F-Verteilung traten erst in der fünften Stelle nach dem Komma, für die t-Verteilung erst in der sechsten Stelle nach dem Komma auf.

3. Untersuchungen zur Metabolisierung aromatischer Amine

3.1. Metabolismus und Metabolitenabgabe der p-Aminobenzoessäure

3.1.1. Identifikation der Metaboliten

PABA wird am Darm des Meerschweinchens, dem Colon der Ratte wie auch an humanen Mukosapräparaten des Dün- und Dickdarmes zu N-Acetyl-p-aminobenzoessäure umgesetzt. Die Identifikation des Metaboliten erfolgte dünn-schichtchromatographisch über Co-Chromatographie der Versuchssinkubate in drei verschiedenen Lösungsmittelsystemen mit den Referenzsubstanzen PABA, Ac-PABA, PAH und Ac-PAH. Die Detektion der nicht aktiv markierten Substanzen erfolgte in der Regel über die UV-Löschwirkung, im Falle des PABA aber auch durch eine Azo-Kuppelung der Aminogruppe mit 1-Naphthol. Ac-PABA konnte nach einer sauren Hydrolyse der Acetylgruppe auf der Platte ebenfalls über diese Reaktion nachgewiesen werden.

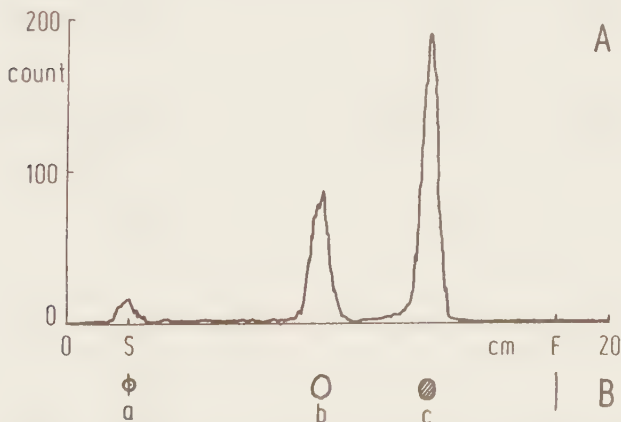


Abb.4: Radiochromatogramm einer typischen Trennung eines Versuchssinkubates 20 μ M PABA, lumenseitiges Angebot Meerschweinchen-Jejunum, aufgetragen wurden 10 μ l der lumenseitigen Inkubationslösung mit 0,0056 μ Ci und 10^{-8} mol nicht radioaktiv markiertes PABA und Ac-PABA als Referenz; Laufmittel I, (A) Radiochromatogramm, (B) UV-Detektion (s.a.2.7.2.) (S) Start, (F) Front, (a) Auftrageartefakt, (b) Ac-PABA, (c) PABA,

Neben diesem Metaboliten konnte häufig ein weiterer Peak im Radiochromatogramm (Abb.4, a) im Bereich des Auftragefleckes nachgewiesen werden. Dieser Peak erwies sich als Gemisch aus im Auftragebereich gebundenem PABA und einem Abbauprodukt der Säure. Dieses Abbauprodukt entsteht auch in einer wässrigen, hochkonzentrierten Lösung von PABA unter Einwirkung des Tageslichts und kann dabei als gelbliche Verfärbung beobachtet werden. Ebenfalls sichtbar wurde dieses Abbauprodukt als gelbe Verfärbung an der Stelle des mitaufgetragenen PABA bei dünnschichtchromatographischen Platten, die längerer Lichteinwirkung ausgesetzt waren. Die hier beobachtete chemische Umwandlung von PABA unter Lichteinwirkung ist auch in der Literatur beschrieben (Lazzell und Johnston, 1928, Bruze und Fregert, 1983).

Der Anteil dieses Zerfallsproduktes in der Inkubationslösung der Angebotsseite änderte sich im Verlauf der Inkubation nicht. In den Extrakten der Mukosa und in den Gegenlösungen fanden sich nur vereinzelt Spuren dieser Verbindung. Bei Versuchen mit kontinuierlicher Probenentnahme wie der in vivo-Perfusion war der im Auftragebereich gebundene Anteil in allen Proben identisch.

Tab.2: Gesamtmetabolisierungsrate nach lumen- oder blutseitigem Angebot von 0,02 bis 2 mM PABA am Meerschweinchen-Jejunum und Colon; alle Angaben in Prozent der eingesetzten Menge (=100 %)

Angebotsseite	Lumen			Blut		
Konzentration (mM)	0,02	0,10	2,00	0,02	0,10	2,00
Jejunum:						
Umgesetzt (%)	26,24	20,55	5,83	32,66	22,70	7,01
S.E.M.	4,53	-----	-----	2,82	-----	-----
N	5	1	1	5	1	1
Colon:						
Umgesetzt (%)	27,30	21,88	7,27	37,53	28,39	6,36
S.E.M.	3,90	-----	-----	2,95	-----	-----
N	5	1	1	6	1	1

3.1.2. Gesamtmetabolisierung bei steigender Angebotskonzentration

Die Metabolisierung von PABA ist an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums und Colons ein sättigungsfähiger Prozeß. Eine steigende Konzentrationen an PABA in der Angebotslösung führt zur Verminderung des zu Ac-PABA umgesetzten Anteils der eingesetzten Menge (Abb.5, Tab.2).

Die Metabolisierungsrate ist abhängig von der Seite des Angebotes; bei 20 μM Angebotskonzentration am Jejunum wie bei 20 und 100 μM am Colon ist dabei die Metabolisierungsrate nach blutseitigem Angebot deutlich höher als nach lumenseitigem Angebot. Steigende Angebotskonzentrationen führen hier zu einer Angleichung der Gesamtmetabolisierungsrate, unabhängig von der Angebotsseite, auf ein annähernd gleiches Niveau (Tab.2).

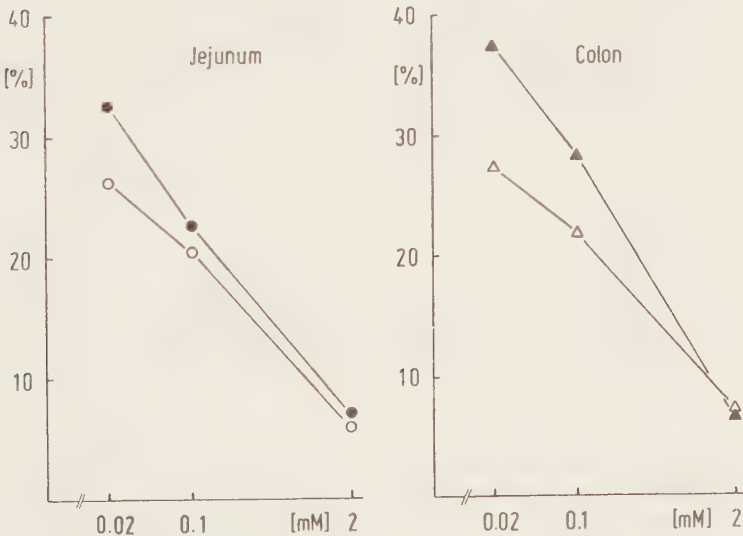


Abb.5: Gesamtmenge an gebildetem Konjugat in Prozent der eingesetzten Menge unter verschiedenen Angebotskonzentrationen nach lumen- (offene Symbole) und blutseitigem Angebot (geschlossene Symbole) am Jejunum (●) und Colon (▲) des Meerschweinchens

Ein Vergleich zwischen Jejunum und Colon macht die höhere Konjugationskapazität des Colons deutlich. Bezieht man die Menge an Gesamtkonjugat dabei nicht, wie in der Abbildung, auf jeweils eine Mukosa, sondern auf das Feuchtgewicht der Mukosae (Feuchtgewicht: Jejunum =10.97mg vs. Colon =5.06mg), so wird dieser Unterschied noch deutlicher.

3.1.3. Verteilung von Substrat und Metabolit am Jejunum des Meerschweinchens

3.1.3.1 Konzentrationsabhängigkeit

Bei einer Angebotskonzentration von 20 μM besteht der im Gewebe und auf der Gegenseite zu bestimmende Tracer annähernd vollständig aus acetyliertem PABA (Abb.6, Tab.3). Mit steigender Konzentration nimmt der Anteil an gebildetem Konjugat zugunsten der unkonguierten Säure ab. Dabei ändert sich in den Inkubaten der Gegenlösung die Gesamtmenge des Tracers nicht. Im Gewebe ist dagegen eine deutliche Abnahme der Aktivität zwischen 20 und 100 μM , analog zu den Permeationsversuchen (vgl. 3.3.1.1), festzustellen. Die Verteilung zwischen Substrat und Metabolit verändert sich darüber hinaus wie in den Inkubaten der Gegenlösung. Prozentual ist der Anteil des Metaboliten in allen Fällen, wenn auch zum Teil nur geringfügig, in den Eluatn der Mukosae höher als in der Gegenlösung (Tab.3).

Tab.3: Verteilung von Ac-PABA und PABA an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunum nach lumen- oder blutseitigem Angebot von 20 μM PABA (=100 %); alle Angaben in Prozent

		Lumen		Mukosa		Blut	
		PABA	Ac-PABA	PABA	Ac-PABA	PABA	Ac-PABA
Angebot Lumen:							
20 μM		73,73	22,24	0,026	2,527	0,010	1,473
	S.E.M.	4,53	4,70	0,026	0,479	0,010	0,264
	N = 5						
Angebot Blut:							
20 μM		n.d.	3,684	0,021	3,307	67,19	25,67
	S.E.M.		0,329	0,021	0,586	2,79	3,08
	N = 5						

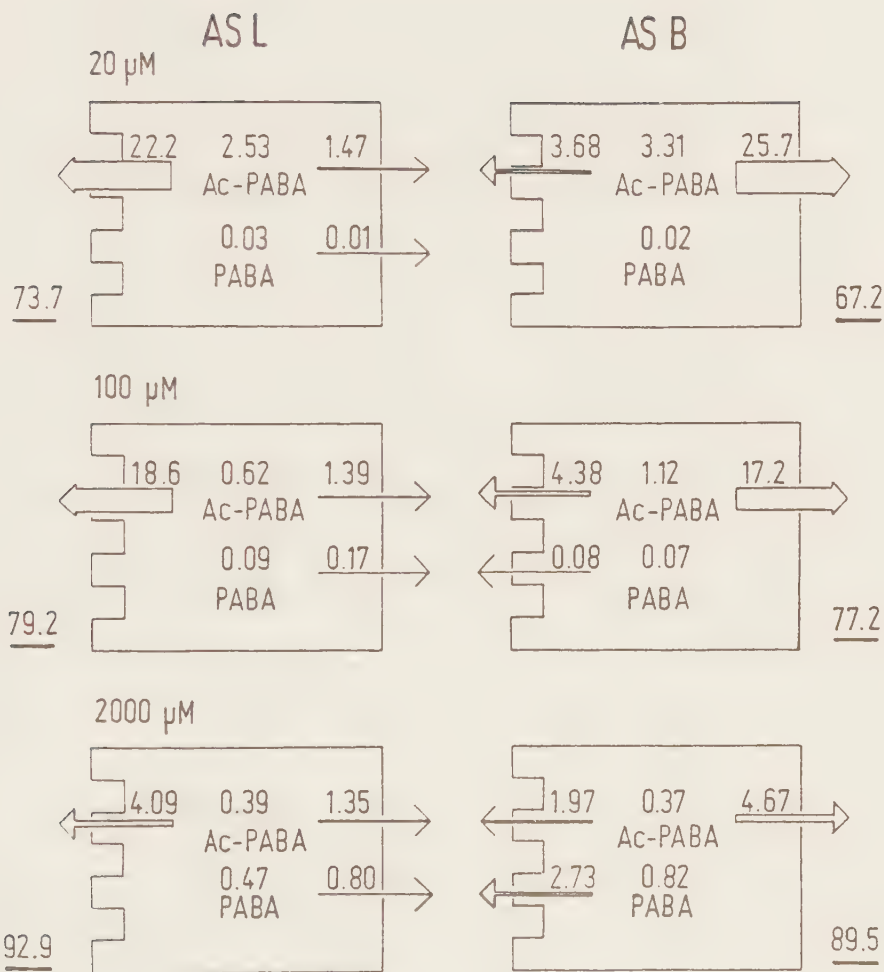


Abb.6: Konjugatbildung und Verteilung an der isolierten Mukosa des Meer-schweinchen-Jejunums unter verschiedenen Angebotskonzentrationen; Angaben in Prozent des eingesetzten Substrates, linke Hälfte: lumen-seitiges, rechte Hälfte: blutseitiges Angebot, unterstrichene Werte: auf der Angebotsseite verbliebenes unkonjugiertes PABA; Anzahl der Versuche: 20 μM N=5, 100 μM und 2 mM N=1

Tab.4: Relative Verteilung von Ac-PABA (=100 %) am Jejunum des Meerschweinchens

	Angebotsseite Lumen			Angebotsseite Blut		
	Lumen	Mukosa	Blut	Lumen	Mukosa	Blut
20 μ M	82.325	10.846	6.828	11.521	10.701	77.778
SEM	3.727	2.480	1.963	1.287	2.417	3.118
N	5	5	5	5	5	5
100 μ M	90.239	2.997	6.763	19.335	4.917	75.748
2000 μ M	70.187	6.670	23.143	28.165	5.238	66.597

Betrachtet man die relative Verteilung des Metaboliten (Tab.4), so wird die überwiegende Ausschleusung des Konjugates zur jeweiligen Angebotsseite deutlich. Bei einer Angebotskonzentration von 20 μ M fanden sich dabei 82 % der Gesamtmenge an gebildetem Konjugat nach lumenseitigem Angebot in der lumenseitigen Inkubationslösung und 78 % nach blutseitigem Angebot in der blutseitigen Inkubationslösung (Tab.4). Bei steigender Konzentration der Angebotslösung auf 2 mM scheint sich dieser Anteil zugunsten der in der Gegenseite zu bestimmenden Menge zu verringern.

3.1.3.2 Versuche zur Schädigung des lumenseitigen Metabolisierungsraumes

Die vergleichsweise große Menge an lumenseitig abgegebenem Ac-PABA nach lumenseitigem Angebot des Substrates legte nahe, nach dem räumlichen Äquivalent der Konjugationsreaktion zu suchen. Als Methode der Wahl bot sich dabei eine von Schorn (1986) auf die isolierten Mukosa adaptierte Weiser-Technik an. Dabei wurden die Mukosae lumenseitig 60 min mit einer kalzium- und magnesiumfreien Lösung (phosphate-buffered-saline, PBS) mit 5 mM EDTA vorinkubiert. Dabei sollten, abhängig von der Inkubationszeit, die Mukosa-Zellen sequentiell, beginnend am proximalen Ende der Villi-Tips, abgeschwemmt werden. In der Auswertung der Versuche zur Schädigung des lumenseitigen Metabolisierungsraumes werden alle Ergebnisse sowohl gegen die mitgeführten wie auch gegen alle Kontrollen verglichen und dabei als ein Vielfaches dieser Werte angegeben.

Nach Vorbehandlung der Mukosa kommt es zu einer deutlichen Steigerung der Menge an acetyliertem Substrat. Gegenüber der mitgeführten Kontrolle entspricht dies einer Erhöhung um das 4.4fache; gegenüber allen Kontrollwerten (Tab.3) mit lumenseitigem Angebot beträgt dieser Faktor 2.3. Aufgeschlüsselt auf lumen- und blutseitige Inkubationslösung und Gewebe (Abb.7, Tab.5) findet sich eine Steigerung des Anteils an Ac-PABA in allen Teilbereichen. So ist die zur lumenseitigen Angebotsseite rücksezernierte Menge an Konjugat gegenüber der mitgeführten Kontrolle um den Faktor 5.0 (2.2 gegen alle Kontrollen), im Gewebe um den Faktor 2.4 (2.0) und auf der Gegenseite um den Faktor 3.1 (3.2) erhöht.

Darüberhinaus kann ein weiterer, weder mit Ac-PABA, PAH (Rf=0,23) oder Ac-PAH (Rf=0,075) identischer Metabolit (Met.2) mit einem Rf-Wert von 0,69 nachgewiesen werden. Dieser Metabolit wird, ana-

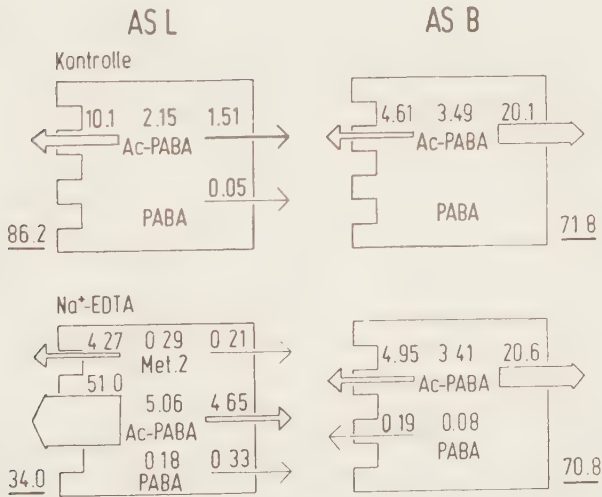


Abb.7: Konjugatbildung und Verteilung an der isolierten Mukosa des Meer-schweinchen-Jejunums unter Einfluß einer Vorinkubation von 60 min mit Na⁺-EDTA in PBS-Puffer, Angebot 20 µM PABA, Legende s. Abb.6

Tab.5: Einfluß einer einstündige lumenseitige Vorinkubation mit 5 mM Na'-EDTA auf die Metabolisierung und Metabolitenverteilung von 20 µM lumen- oder blutseitig angebotenem PABA (=100 %); alle Angaben in Prozent

		Lumen	Mukosa	Blut	Summe des Metaboliten
Angebotsseite Lumen:		-----	-----	-----	-----
Kontrolle					
N = 1	PABA	86,18	n.d.	0,048	13,77
	Ac-PABA	10,11	2,15	1,51	
	Met.2	n.d.	n.d.	n.d.	
EDTA					
N = 2	PABA	34,03	0,186	0,330	60,68
	SEM	2,00	0,024	0,179	
	Ac-PABA	50,98	5,06	4,65	
	SEM	3,10	0,50	0,51	
	Met.2	4,27	0,289	0,210	
	SEM	0,09	0,004	0,025	
		Lumen	Mukosa	Blut	Summe des Metaboliten
Angebotsseite Blut:		-----	-----	-----	-----
Kontrolle					
N = 1	PABA	n.d.	n.d.	71,77	28,23
	Ac-PABA	4,61	3,49	20,13	
	Met.2	n.d.	n.d.	n.d.	
EDTA					
N = 2	PABA	0,193	0,077	70,77	28,92
	SEM	0,020	0,014	1,23	
	Ac-PABA	4,95	3,41	20,57	
	SEM	0,41	0,004	0,74	
	Met.2	n.d.	n.d.	n.d.	

log zum Ac-PABA, überwiegend zur Angebotsseite abgegeben, ist jedoch auch in geringer Konzentration im Gewebe und auf der Gegenseite zu bestimmen. Eine Identität dieses Metaboliten mit dem in der Literatur beschriebenen Glukuronid (Rf-Wert geschätzt auf 0) erscheint aufgrund des hohen Rf-Wertes dieser Verbindung unwahrscheinlich.

Nach blutseitigem Angebot ergibt sich gegenüber der mitgeführten Kontrolle keinerlei Veränderung in der Menge an Gesamtkonjugat oder dessen Verteilung. Der neue Metabolit kann weder im Gewebe noch in einem der Inkubate nachgewiesen werden. Der geringe, auf der Gegenseite gemessene Anteil an freiem PABA könnte sich aus einer unspezifischen Schädigung der Mukosa durch das eingesetzte EDTA ergeben. In Kontrollversuchen mit PEG900 als Markersubstanz ist dabei sowohl die shunt-Permeabilität nach lumenseitigem Angebot mit einer Durchtrittsrate von $0,752 \pm 0,026 \%$, $N=2$, (gegenüber sonst $0,367\%$) wie nach blutseitigem Angebot mit $0,946 \pm 0,155 \%$, $N=2$, ($0,495\%$) sowie der Extrazellulärraum (ER) der Lumen-seite mit $25,5 \pm 0,05 \%$, $N=2$, ($15,64\%$) gegenüber einer Inkuba-tion ohne EDTA (Tab.9b) erhöht. Der blutseitige ER ist dagegen unter Einfluß von EDTA mit $11,0 \pm 0,47 \%$, $N=2$, gegenüber $13,9 \%$ nur wenig verändert.

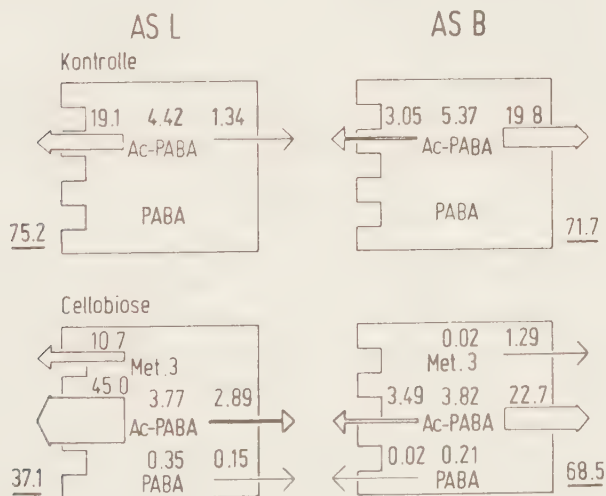


Abb.8: Schädigung der Mukosa durch eine lumenseitige hyperosmolare Vorinkubation : Konjugatbildung und Verteilung an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums unter Einfluß einer Vorinkubation von 30 min mit 400 mOsmol Cellobiose, Angebot 20 µM PABA, Legende s. Abb.6

Als weitere Methode einer lumenseitigen Schädigung des mukosalen Gewebes wurde von Schorn (1986) eine hyperosmolare Vorinkubation der Mukosae in Anlehnung an einer Methode von Roggin vorgeschlagen. Dabei wurde die Lumenseite mit einer hyperosmolaren Lösung 30 min vorinkubiert. Anschließend wurde diese Lösung entfernt und die Kammern zweimal mit normotonem Versuchspuffer ausgewaschen. Die Osmolarität der hypertonen Vorinkubationslösung wurde in einem Versuchsansatz über eine Zugabe von Cellobiose mit einer Osmolarität von 400 mOsmol/l, in einem weiteren Versuchsansatz über eine Zugabe von Na⁺-Cyclamat mit 2 Osmol/l eingestellt.

Bei der Vorinkubation mit Cellobiose zeigt sich ein dem der Vorbehandlung mit EDTA ähnliches Bild (Abb.8,Tab.6). Wieder ist die Menge des Gesamtkonjugates nach lumenseitigem Angebot von PABA gegenüber der mitgeführten Kontrolle um den Faktor 2.1 (2.0 gegen alle Kontrollen) deutlich erhöht. Der im Gewebe zu bestimmende Anteil ist in der mitgeführten Kontrolle wie auch im hyperosmolar vorbehandeltem Gewebe deutlich höher als in allen Kontrollen, so daß hier, zumindest bezogen auf den mitgeführten Standard, keine Erhöhung der Konzentration festzustellen ist (Abb.6, Abb.8). Dagegen ist der Anteil an zur Lumenseite rücksezerniertem Ac-PABA um den Faktor 2.4 (2.0), der auf der Gegenseite zu messende Anteil um den Faktor 2.2 (2.0) erhöht (Abb.8,Tab.6).

Wie bei der Behandlung mit EDTA läßt sich auch in diesem Fall ein neuer Metabolit (Met.3) feststellen. Anhand des Rf-Wertes von 0,28 ist jedoch eine Identität mit dem unter Einfluß des EDTA auftretenden Metaboliten auszuschließen; der hier gefundene Metabolit ist deutlich polarer als die vorgenannte Verbindung. Der Metabolit kann sowohl nach lumen- wie blutseitigem Substratangebot nachgewiesen werden und findet sich nach lumenseitigem Angebot ausschließlich in der Angebotslösung, nach blutseitigem Angebot in Spuren in der Mukosa und, in ebenfalls geringer Quantität, in der Angebotslösung (Abb.8,Tab.6). Die Metabolisierungsrate und Verteilung des gebildeten Ac-PABA nach blutseitigem Substratangebot ist sowohl zu der mitgeführten Kontrolle wie auch zu allen Kontrollwerten gleich.

Tab.6: Hyperosmolare Schädigung der Mukosae durch lumenseitige Vorinkubation mit 400 mOsmol Cellobiose und Verteilung von PABA und Ac-PABA an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums nach lumen- oder blutseitigem Angebot von 20 μ M PABA; alle Angaben in Prozent der eingesetzten Menge (=100 %)

		Lumen	Mukosa	Blut	Summe des Metaboliten
Angebotsseite Lumen:					
Kontrolle					
N = 1	PABA	75,19	n.d.	n.d.	
	Ac-PABA	19,07	4,42	1,34	24,83
	Met.3	n.d.	n.d.	n.d.	
Cellobiose					
N = 2	PABA	37,16	0,348	0,152	
	SEM	3,89	0,073	0,017	
	Ac-PABA	45,00	3,77	2,89	51,66
	SEM	1,11	0,94	0,10	1,94
	Met.3	10,68	n.d.	n.d.	10,68
	SEM	1,86			1,86
		Lumen	Mukosa	Blut	Summe des Metaboliten
Angebotsseite Blut:					
Kontrolle					
N = 1	PABA	n.d.	n.d.	71,74	
	Ac-PABA	3,05	5,37	19,84	28,26
	Met.3	n.d.	n.d.	n.d.	
Cellobiose					
N = 2	PABA	0,017	0,205	68,48	
	SEM	0,017	0,032	0,83	
	Ac-PABA	3,49	3,82	22,68	29,99
	SEM	0,97	0,57	0,32	0,72
	Met.3	n.d.	0,017	1,29	1,31
	SEM		0,017	0,07	0,09

Die Vorinkubation der Mukosae mit Na'-Cyclamat war als einzige Maßnahme in der Verringerung der lumenseitig abgegebenen Menge an acetyliertem PABA erfolgreich (Abb.9,Tab7.). Aufgrund der Verringerung dieses Anteils sinkt nach lumenseitigem Angebot von PABA die Menge an Gesamtkonjugat gegenüber den mitgeführten Kontrollen auf den Faktor 0.26 (0.35 gegen alle Kontrollen). Dabei steigt der

im Gewebe gemessene Anteil (2.4/2.0) an Konjugat, während er auf der Gegenseite weitgehend gleich bleibt (0.65/1.4). Die in diesem Raum bestimmte höhere Aktivität ist auf einen drastisch angestiegenen Anteil an unkonjugiertem PABA zurückzuführen. Deutlich erniedrigt auf den Faktor 0.10 (0.14) ist ausschließlich die zur Angebotsseite zurücksezernierte Menge an Ac-PABA (Abb.9, Tab.7).

Nach lumenseitigem osmolarem Schock mit Cyclamat und blutseitigem Angebot von PABA ergeben sich außer einem erhöhten Spiegel an Ac-PABA im Gewebe keinerlei Unterschiede in Bildung und Abgabe des Metaboliten. Ein neuer Metabolit, wie unter Einfluß von EDTA und Cellobiose aufgetreten, kann ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

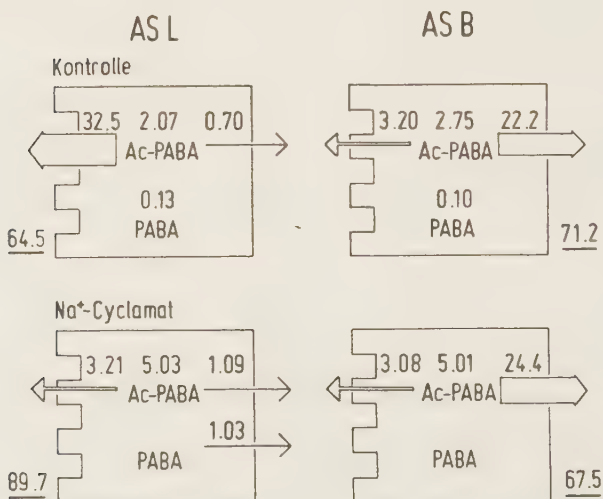


Abb.9: Schädigung der Mukosa durch eine lumenseitige hyperosmolare Vorinkubation : Konjugatbildung und Verteilung an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums unter Einfluß einer Vorinkubation von 30 min mit 2 Osmol Na⁺-Cyclamat, Angebot 20 µM PABA, Legende s.Abb.6

Tab.7: Hyperosmolare Schädigung der Mukosae durch lumenseitige Vorinkubation mit 2 Osmol Na-Cyclamat und Verteilung von PABA und Ac-PABA an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums nach lumen- oder blutseitigem Angebot von 20 μ M PABA; alle Angaben in Prozent der eingesetzten Menge (=100 %)

	Lumen		Mukosa		Blut	
	PABA	Ac-PABA	PABA	Ac-PABA	PABA	Ac-PABA
Angebot Lumen: Kontrolle	64,50	32,45	0,131	2,069	n.d.	0,700
Hyperosmolar	89,66	3,205	n.d.	5,025	1,025	1,090
S.E.M. N = 2	0,30	0,285		0,025	0,005	0,020
Angebot Blut : Kontrolle	n.d.	3,200	0,104	2,749	71,21	22,18
Hyperosmolar	n.d.	3,080	n.d.	5,005	67,54	24,38
S.E.M. N = 2		0,380		0,105	2,30	2,03

3.1.4. Verteilung von Substrat und Metabolit am Colon des Meerschweinchens

3.1.4.1 Konzentrationsabhängigkeit

Bei der kleinsten gewählten Angebotskonzentration von 20 μ M findet sich im Gewebe wie auf der Gegenseite sowohl bei lumen- wie blutseitigem Substratangebot fast ausschließlich konjugiertes PABA (Abb.10,Tab.9). Mit steigender Angebotskonzentration sinkt der Anteil acetylierter Säure zugunsten des unkonjugierten Substrates, wobei die relative Verteilung zwischen PABA und Ac-PABA in Mukosa und Gegenlösung bei allen untersuchten Konzentrationen gleich ist.

Die bevorzugte Seite der Abgabe des Metaboliten ist abhängig von der Seite des Angebotes. Nach blutseitiger Gabe erscheint der größte Anteil an acetyliertem Substrat auf der Angebotsseite (Tab.8). Dagegen verteilt sich nach lumenseitigem Angebot von PABA die acetylierte Verbindung in einer Ratio zwischen 1:0.85 und 1:1.7 zwischen der Lumen- und der Blutseite. Dabei ist der auf der Lumenseite zu bestimmende Anteil an Konjugat bei lumenseitigem Substratangebot (Abb.10) 7-10mal höher als nach blutseitigem Substratangebot.

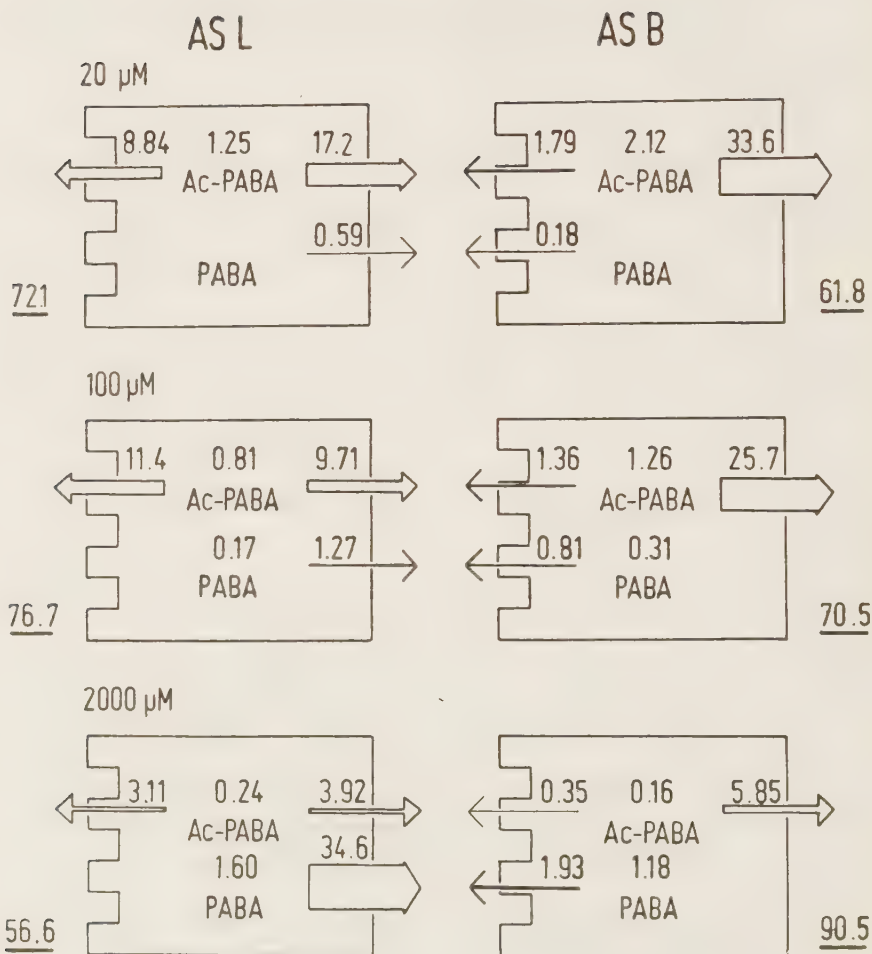


Abb.10 Konjugatbildung und Verteilung an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Colons unter verschiedenen Angebotskonzentrationen; Angaben in Prozent des eingesetzten Substrates, linke Hälfte: lumen-seitiges, rechte Hälfte: blutseitiges Angebot, unterstrichene Werte: auf der Angebotsseite verbliebenes unkonjugiertes PABA; Anzahl der Versuche: 20 µM N=5-6, 100 µM und 2mM N=1

Tab.8: Relative Verteilung von Ac-PABA (=100 %) am Colon des Meerschweinchens

	Angebotsseite Lumen			Angebotsseite Blut		
	Lumen	Mukosa	Blut	Lumen	Mukosa	Blut
20 μ M	35.139	4.525	60.336	5.082	5.951	88.967
SEM	6.810	0.595	6.546	1.152	0.875	1.873
N	5	5	5	6	6	6
100 μ M	51.923	3.696	44.382	4.791	4.431	90.778
2000 μ M	42.787	3.320	53.893	5.479	2.581	91.939

Trotz der relativ großen Streuung der Einzeldaten, vor allem im Bereich der Gewebsgehalte und der Resorptionsraten nach einem lumenseitigem Substratangebot (Tab.9), lagen die in diesen Versuchen ermittelten Werte durchaus im Rahmen normaler Versuchswerte und konnten beispielsweise auch in vergleichbaren Versuchen zum Permeationsmechanismus (vgl. 5.1.2.) erhalten werden.

Tab.9: Verteilung von Ac-PABA und PABA an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Colons nach lumen- oder blutseitigem Angebot von 0,02 mM PABA; alle Angaben in Prozent der eingesetzten Menge (=100 %)

	Lumen		Mukosa		Blut	
	PABA	Ac-PABA	PABA	Ac-PABA	PABA	Ac-PABA
Angebot Lumen:						
0,02 mM	72,12	8,84	n.d.	1,254	0,594	17,21
S.E.M.	4,11	1,19	.	0,220	0,308	3,83
N = 5						
Angebot Blut:						
0,02 mM	0,175	1,794	n.d.	2,124	61,82	33,61
S.E.M.	0,126	0,271		0,190	3,29	3,17
N = 5						

3.1.4.2 Metabolisierung und Metabolitenabgabe am Colon unter Einfluß von Phenoxybenzamin

Ein Kriterium einer carriervermittelten Permeation ist die Hemmbarkeit dieses Mechanismus durch verschiedene spezifische und unspezifische Inhibitoren. In einem Versuch wurde aus diesem Grunde der Einfluß des alkylierenden Agens Phenoxybenzamin (PBA)

auf die Bildung und Abgabe der konjugierten Verbindung bei 20 μM Substratangebot untersucht. Nach einer zweistündigen Vorinkubation der Mukosae mit dieser Substanz wurde das Gewebe auch während der

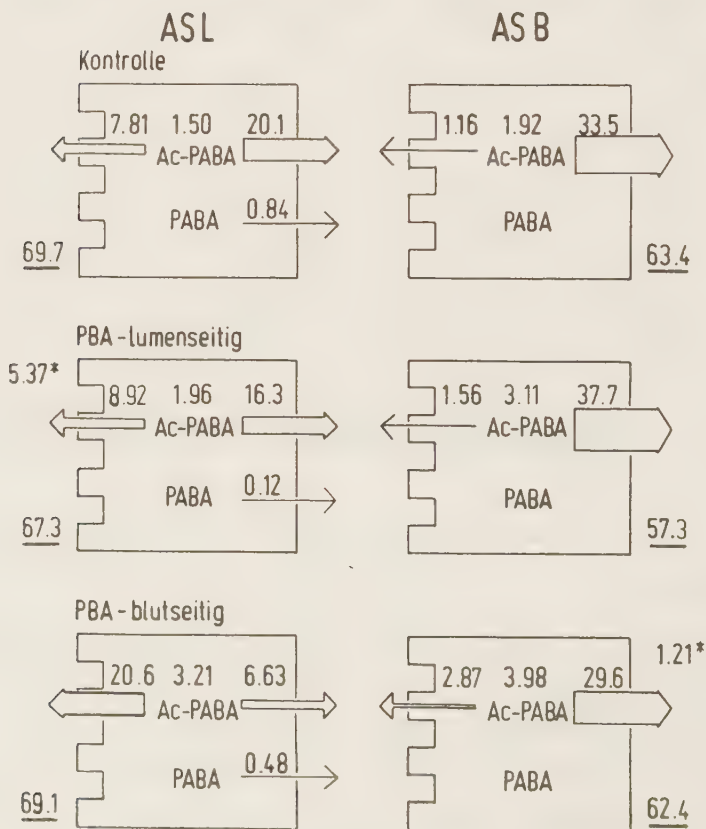


Abb.11: Konjugatbildung und Verteilung an der isolierten Mukosa des Meer-schweinchens-Colons unter Einfluß lumen- (Mitte) oder blutseitig (unten) gegebenem Phenoxybenzamins. 20 μM PABA wurden lumen- (linke Bildhälfte) oder blutseitig (rechte Bildhälfte) eingesetzt. Unterstrichene Werte entsprechen dem auf der Angebotsseite verbliebenem unkonjugiertem PABA, mit Sternchen versehene Werte der auf der Angebotsseite aufgefundenen unbekannten Verbindung

Tab.10: Einfluß von lumen- oder blutseitig gegebenem Phenoxybenzamin (PBA) auf die Metabolisierung und Verteilung von PABA an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Colons nach lumen- oder blutseitigem Angebot von 20 μ M PABA; alle Angaben in Prozent der eingesetzten Menge (=100 %)

		Lumen	Mukosa	Blut	Summe des Metaboliten
PABA Angebotsseite Lumen:					
Kontrolle					
N = 2	PABA SEM	69,73 9,20	n.d.	0,840 0,840	
	Ac-PABA SEM	7,81 1,92	1,50 0,23	20,12 6,21	29,43 8,36
	???	n.d.	n.d.	n.d.	
PBA, lumenseitig					
N = 2	PABA SEM	67,35 3,36	n.d.	0,12 0,12	
	Ac-PABA SEM	8,92 0,95	1,96 0,09	16,30 2,14	27,17 3,17
	???	5,37 0,33	n.d.	n.d.	5,37 0,33
PBA, blutseitig					
N = 2	PABA SEM	69,12 2,29	n.d.	0,475 0,475	
	Ac-PABA SEM	20,57 2,99	3,21 0,12	6,63 0,35	30,41 2,76
	???	n.d.	n.d.	n.d.	
		Lumen	Mukosa	Blut	Summe des Metaboliten
PABA Angebotsseite Blut:					
Kontrolle					
N = 2	PABA SEM	n.d.	n.d.	63,45 4,71	
	Ac-PABA SEM	1,16 0,04	1,92 0,10	33,49 4,66	36,56 4,72
	???	n.d.	n.d.	n.d.	
PBA, lumenseitig					
N = 2	PABA SEM	n.d.	n.d.	57,34 4,64	
	Ac-PABA SEM	1,56 0,04	3,11 0,35	37,74 4,00	42,41 4,39
	???	n.d.	n.d.	n.d.	
PBA, blutseitig					
N = 2	PABA SEM	n.d.	n.d.	62,37 0,82	
	Ac-PABA SEM	2,87 0,11	3,98 0,12	29,57 0,40	36,42 0,39
	???	n.d.	n.d.	1,21 1,21	1,21 1,21

Inkubationszeit auf je einer Seite mit PBA inkubiert. Neben diesen Untersuchungen zur Metabolisierung wurden Versuche unter Einfluß von PBA im Rahmen von Permeationsexperimenten (vgl. 7.2.6) durchgeführt.

Vergleicht man die Menge an umgesetztem Gesamtkonjugat unter Einfluß des PBA mit den mitgeführten Kontrollen wie auch mit allen Kontrollwerten, so kann unter keiner Bedingung eine Veränderung der Gesamtacetylierung in dem Versuchssystem beobachtet werden. Dagegen verändert sich die Verteilung des gebildeten Konjugates (Abb.11, Tab.10). Nach lumenseitiger Inhibitorgabe steigen, sowohl nach lumen- wie blutseitigem Substratangebot, die im Gewebe bestimmten Mengen an Ac-PABA. Bei blutseitiger Gabe des Phenoxybenzamins und lumenseitigem PABA ergeben sich deutlichere Unterschiede. So steigt der zur Lumenseite rücksezernierte Anteil an Ac-PABA um den Faktor 2.6 und der im Gewebe zu messende Anteil um den Faktor 2.1, während gleichzeitig die zur Blutseite abgegebene Menge um den Faktor 3.0 sinkt. Nach blutseitigem Angebot von PABA und blutseitiger Inhibitorgabe ist der im Gewebe zu messende Anteil an Ac-PABA um den Faktor 2.1 erhöht. Gleichzeitig steigt der zur Gegenseite abgegebene Anteil um den Faktor 2.5. Die Abgabe des Metaboliten zur Angebotsseite ist dagegen gegenüber den Kontrollwerten nur geringfügig erniedrigt (Abb.11, Tab.10).

Bei der Untersuchung des Einflusses von PBA auf die Metabolisierung und Metabolitenabgabe von PABA kann in den Lösungen der Angebotsseiten im Radiochromatogramm ein weiterer Peak mit einem Rf-Wert von 0,27 ausgemacht werden. Diese Verbindung findet sich ausschließlich in den Inkubaten der Angebotsseiten, welche zusätzlich zum PABA auch PBA enthalten. Da PBA eine relativ instabile und reaktionsfreudige Verbindung darstellt, ist es möglich, daß es sich hier nicht um einen Metaboliten, sondern um ein chemisches Reaktionsprodukt des Inhibitors mit der Säure handelt.

3.1.5. Verteilung von Substrat und Metabolit an humanen Mukosa- präparaten

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit mehreren Bochumer Kliniken war es möglich, Untersuchungen an humanem Operationsmaterial durchzuführen. Als einziger Metabolit der p-Aminobenzoesäure konnte dabei N-Acetyl-p-aminobenzoesäure identifiziert werden.

3.1.5.1 Versuche am Dünndarm

Die Metabolisierung und Metabolitenverteilung von PABA am menschlichen Dünndarm entspricht weitgehend den am Meerschweinchen-Jejunum erhobenen Befunden (Abb.12,Tab.11). Die untersuchten Darmabschnitte entsprechen in ihrer Lage dem distalen Duodenum und dem proximalen Jejunum, eine genauere Lokalisation ist aufgrund der

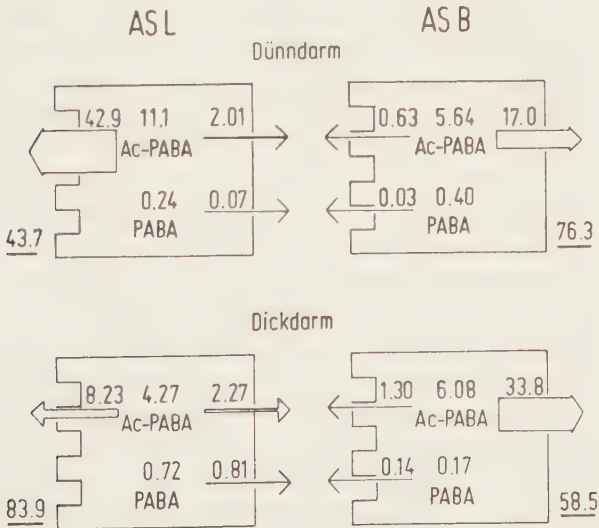


Abb.12: Konjugatbildung und Verteilung an isolierten Humanmukosapräparaten des Dün- (oben) und Dickdarms (unten) nach lumen- (links) oder blut-seitigem (rechts) Angebot von 20 µM PABA, Legende s. Abb.6

Tab.11: Verteilung von Ac-PABA und PABA an der isolierten Mukosa des menschlichen Dün- und Dickdarms nach lumen- oder blutseitigem Angebot von 20 μ M PABA; alle Angaben in Prozent der eingesetzten Menge (=100 %)

	Lumen		Mukosa		Blut		Summe
	PABA	Ac-PABA	PABA	Ac-PABA	PABA	Ac-PABA	Ac-PABA
Dünndarm							
Angebot Lumen	43,65	42,91	0,236	11,11	0,071	2,010	56,03
S.E.M. N = 14	3,58	3,25	0,091	0,82	0,036	0,493	3,65
Angebot Blut	0,032	0,634	0,399	5,641	76,28	17,04	23,32
S.E.M. N = 13	0,019	0,154	0,103	0,201	2,52	2,39	2,59
Dickdarm							
Angebot Lumen	83,95	8,233	0,720	4,270	0,810	2,272	14,77
S.E.M. N = 10	1,56	1,243	0,202	0,707	0,368	0,540	1,59
Angebot Blut	0,137	1,295	0,171	6,079	58,47	33,84	41,21
S.E.M. N = 10	0,067	0,312	0,056	0,764	3,16	2,88	3,11

fehlenden Angaben der Kliniken nicht möglich. Die Angebotskonzentration betrug in allen Fällen 20 μ M. Die Rate der Gesamtacetylierung ist nach lumenseitigem Angebot der Säure höher, nach blutseitigem Angebot etwas niedriger als beim Meerschweinchen.

Der Unterschied in der Gesamtkonjugationsrate zwischen dem humanen Material und der Meerschweinchen-Mukosa ergibt sich aus der zur Angebotsseite abgegebenen Menge an Metabolit (Tab.12). Im Vergleich ist die zur Lumenseite rücksezernierte Menge um das 1.9-fache höher, die zur Blutseite ausgeschleuste Menge um das 1.6-fache niedriger als beim Meerschweinchen (Abb.10,12). Der im Gewebe zu bestimmende Anteil an Ac-PABA in Prozent des eingesetzten PABA ist in absoluten Werten höher als beim Meerschweinchen. Bezieht man jedoch diesen Anteil auf das jeweilige Feuchtgewicht der Mukosae, so relativiert sich dieser Befund. Das mittlere Feuchtgewicht der isolierten Humanmukosapräparate des Dünndarms liegt mit 27.57mg um das 2.3fache über dem des Meerschweinchens mit 11.86mg. Der Anteil an Konjugat in Prozent der eingesetzten Menge an PABA im Gewebe ist nach lumenseitigem Angebot um das

4.3fache, nach blutseitigem Angebot nur um das 1.7fache höher als beim Meerschweinchen. Unter Einbeziehung des Feuchtgewichtes ergibt sich somit eine höhere Konzentration des Metaboliten im Gewebe nur bei lumenseitigem Angebot.

Tab.12: Relative Verteilung von Ac-PABA ($\pm 100\%$) an der isolierten Mukosa des menschlichen Dünndarms

	Angebotsseite Lumen			Angebotsseite Blut		
	Lumen	Mukosa	Blut	Lumen	Mukosa	Blut
20 μM	76.180	20.155	3.665	2.833	26.663	70.505
SEM	1.744	1.223	0.831	0.789	1.983	2.177
N	14	14	14	13	13	13

In der Gesamtpermeation des Substrates und des Metaboliten in die Inkubationslösungen der jeweiligen Gegenseiten zeigt sich eine Bevorzugung der Permeation in der resorptiven Richtung. Die flux-ratio als Verhältnis des resorptiven zum sekretorischen Fluß beträgt 3.2 (Tab.11). Die Permeationsraten der einzelnen Präparate verteilen sich mit 0,38- 5,7% bei lumen- und 0,13- 2,4% bei blutseitigem Angebot über einen großen Wertebereich. Bezogen auf Präparate aus dem Operationsmaterial jeweils eines Patienten kann jedoch in allen Fällen im Mittel ein höherer resorptiver als sekretorischer Fluß festgestellt werden.

3.1.5.2 Versuche am Dickdarm

Untersucht wurden in dieser Studie überwiegend Präparate des Colon sigmoides. Eine genaue Zuordnung der Präparate zu einem definierten Darmabschnitt ist jedoch, aus ähnlichen Gründen wie am Jejunum, nicht möglich. Die Angebotskonzentration der Säure betrug in allen Fällen 20 μM . Die Rate der Gesamtacetylierung nach blutseitigem Substratangebot ist dem am Meerschweinchen-Colon erhobenen Befund vergleichbar. Nach lumenseitigem Angebot erweist sich das Meerschweinchen als der bessere Acetylierer.

Tab.13: Relative Verteilung von Ac-PABA (=100 %) an der isolierten Mukosa des menschlichen Dickdarms

	Angebotsseite Lumen			Angebotsseite Blut		
	Lumen	Mukosa	Blut	Lumen	Mukosa	Blut
20 μ M	53.650	28.998	17.353	3.525	14.860	81.615
SEM	3.901	3.854	3.749	1.219	1.898	1.914
N	10	10	10	10	10	10

Bei einer Untersuchung der Verteilung des acetylierten Substrates und der nicht umgesetzten Säure (Abb.12,Tab.11) innerhalb des Versuchssystems bestätigt sich dieser Unterschied. Während nach blutseitigem Angebot die Metabolitenbildung und Verteilung weitgehend der beim Meerschweinchen entspricht, wird am Humanmukosapräparat bei lumenseitigem Angebot ein wesentlich geringerer Anteil (2.72% der Gesamtaktivität) als beim Meerschweinchen (17.25%) auf die Gegenseite transferiert. Dagegen bleibt der als Ac-PABA zur Angebotsseite rücksezernierte Anteil mit 8.23% der Gesamtaktivität in einem zum Meerschweinchen-Colon (8.84%) vergleichbaren Bereich. Der jeweils größte Anteil an acetyliertem Substrat findet sich bei lumenseitigem Angebot auf der Lumenseite, nach blutseitigem Angebot auf der Blutseite (Tab.13). Im Gewebe findet sich am Humanmukosapräparat des Dickdarms mehr Ac-PABA als beim Meerschweinchen. Dabei ist, ähnlich den Präparaten des Dünndarms der Humanmukosa, das mittlere Feuchtgewicht der Humanmukosa mit 20.29mg um das 3.9fache höher als das des Meerschweinchen-Colons mit 5.18mg. Im Vergleich hierzu ist der im Gewebe aufzufindende Anteil an Ac-PABA nach lumenseitigem Angebot von PABA um den Faktor 3.4, der nach blutseitigem Angebot um den Faktor 2.9 gegenüber dem Meerschweinchen erhöht (Abb.10,12,Tab.9,11).

3.2. Metabolismus und Metabolitenabgabe des p-Acetaminophenons

3.2.1. Identifikation der Metaboliten

p-Aminoacetophenon (AAP) wurde als Substrat aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit der Aminobenzoesäure ausgewählt. AAP wird an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums und Colons zu N-Acetyl-p-aminoacetophenon (Ac-AAP) umgesetzt. Die Identifikation des Metaboliten erfolgte über die Retentionszeit der Verbindung in dem zur Analyse eingesetzten HPLC-System. Dabei wurden in Vorversuchen als Vergleichsstandards Leerinkubate ohne Substrat eingesetzt. Zum Zeitpunkt der für AAP wie für Ac-AAP bestimmten Extinktionsänderung kann weder in den Chromatogrammen der blutseitigen und lumenseitigen Inkubationslösung, noch in denen der Mukosae, eine Extinktionsänderung beobachtet werden.

Eine Analyse der Gesamtausbeute deutet auf die Existenz eines weiteren, von Ac-AAP verschiedenen Metaboliten hin. Je nach Angebotsseite des Substrates und dem jeweiligen Darmabschnitt beträgt die Differenz zu einer vollständigen Ausbeute und damit die Größenordnung des zu erwarteten Metaboliten zwischen 4 und 15 % der eingesetzten Menge. An der Gesamtmetabolitenbildung stellt damit Ac-AAP den mit Abstand größten Anteil; je nach Angebotsseite und Darmabschnitt werden zwischen 27 und 49 % des eingesetzten AAP zu Ac-AAP umgesetzt.

3.2.2.1 Verteilung von Substrat und Metabolit am Jejunum des Meerschweinchens

AAP wird von der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums in der untersuchten Konzentration von 100 μ M in einem großen prozentualen Anteil zu Ac-AAP umgesetzt. Die Gesamtmetabolisierungsrate überstieg die für PABA ermittelten Werte sowohl nach lumen- wie blutseitigem Substratangebot. Neben dem Metaboliten Ac-AAP kann in beiden Inkubationslösungen und in der Mukosa ein Anteil an nicht konjugiertem AAP bestimmt werden (Abb.13,Tab.14). Der Anteil an

Ac-AAP im Gewebe ist unabhängig von der Angebotsseite des Substrates in etwa gleich. Die Gesamtmetabolisierungsrate ist abhängig von der Seite des Angebotes; nach lumenseitiger Substratgabe wird insgesamt 48,7 %, nach blutseitiger Gabe dagegen 36,7 % zu Ac-AAP umgesetzt.

Nach blutseitigem Angebot verteilt sich der Metabolit Ac-AAP in ungefähr gleichen Anteilen in die lumen- wie in die blutseitige Inkubationslösung. Nach lumenseitigem Substratangebot findet sich ein hochsignifikant höherer Anteil an gebildetem Ac-AAP auf der Seite des Substratangebotes (Tab.15). Der zur Gegenseite abgegebene Anteil an Ac-AAP ist trotz geringerer Gesamtmetabolisierungsrate nach blutseitigem Substratangebot signifikant höher als nach lumenseitigem Angebot. AAP findet sich nach lumenseitigem Angebot

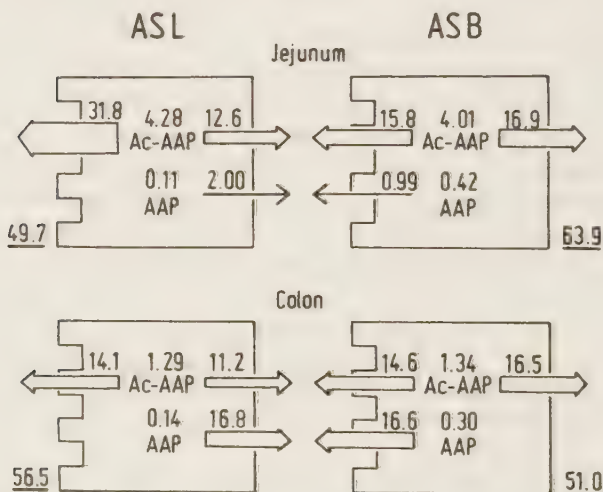


Abb.13: Konjugatbildung und Verteilung an der isolierten Mukosa des Meer-schweinchen-Jejunums (oben) und Colons (unten) nach lumen- (links) oder blutseitigem Angebot (rechts) von 100 µM Aminoacetophenon (AAP). Metabolit: Acetaminoacetophenon (Ac-AAP), Angaben in Prozent der Summe aus AAP und Ac-AAP, unterstrichene Werte: auf der Angebotsseite verbliebenes unkonjugiertes AAP

Tab.14: Verteilung von AAP und Ac-AAP an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums und Colons nach lumen- oder blutseitigem Angebot von 100 μ M AAP; alle Angaben in Prozent der eingesetzten Menge (=100 %)

	Lumen		Mukosa		Blut	
	AAP	Ac-AAP	AAP	Ac-AAP	AAP	Ac-AAP
Jejunum						
Angebot Lumen:						
S.E.M.	49,70	31,77	0,109	4,281	2,002	12,62
N	2,24 13	1,52 13	0,033 13	0,113 13	0,364 14	1,07 14
Angebot Blut :						
S.E.M.	0,991	15,75	0,416	4,008	63,93	16,90
N	0,193 16	0,66 16	0,033 16	0,248 16	1,19 16	0,78 16
Colon						
Angebot Lumen:						
S.E.M.	56,49	14,10	0,136	1,286	16,84	11,17
N	2,95 6	0,91 6	0,011 6	0,211 6	1,47 6	0,79 6
Angebot Blut :						
S.E.M.	16,60	14,63	0,304	1,343	51,01	16,49
N	1,64 8	0,47 8	0,012 8	0,117 8	1,64 6	1,53 6

in einem hochsignifikant geringerem Anteils im Gewebe. In die Inkubate der Gegenseite tritt dagegen signifikant weniger AAP nach blutseitigem Angebot über. Damit ergibt sich für die Ausgangsverbindung AAP eine Netto-Resorption mit höheren Permeationsraten zur Blutseite, für den Metaboliten Ac-AAP dagegen eine Netto-Sekretion mit höheren Permeationsraten zur Lumenseite hin.

Tab.15: Relative Verteilung von Ac-AAP (=100 %) am Meerschweinchen-Jejunum

	Angebotsseite Lumen			Angebotsseite Blut		
	Lumen	Mukosa	Blut	Lumen	Mukosa	Blut
100 μ M	65,28	8,796	25,93	42,96	10,93	46,10
SEM	4,60	0,232	2,20	1,80	0,68	2,13
N						

3.2.2.2 Versuche zur Schädigung des lumenseitigen Metabolisierungsraumes

Wie die Versuche mit AAP am Meerschweinchen-Jejunum zeigen, wird der Metabolit bei lumenseitigem Substratangebot überwiegend zur Lumenseite abgegeben. Dieses Ergebnis deutet damit auf die Existenz eines lumenseitig erreichbaren Kompartimentes der Mukosa hin, in welches das Substrat eintreten, in ihm metabolisiert und dann wieder zur Lumenseite abgegeben werden kann. In Analogie zu den Versuchen mit PABA sollte daher über eine hyperosmolare Schädigung der Lumenseite des Gewebes weitere Information über das räumliche Äquivalent und über die Bedeutung dieses Raumes für die Metabolisierung gewonnen werden. Als Methode der Wahl wurde dabei die im Falle des PABA erfolgreich eingesetzte hyperosmolare Schädigung der Mukosae über eine lumenseitige Vorinkubation mit Na^+ -Cyclamat (2 Osmol/l) eingesetzt.

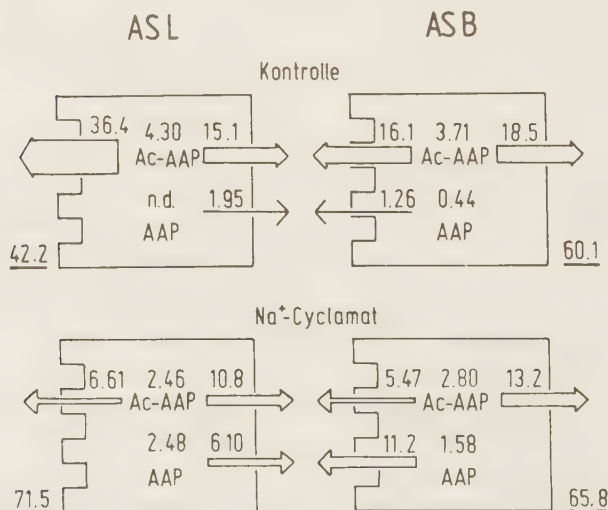


Abb.14: Schädigung der Mukosae durch eine hyperosmolare Vorinkubation: Konjugatbildung und Verteilung an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums unter Einfluß einer Vorinkubation von 30 min mit 2 Osmol Na^+ -Cyclamat, Angebot 100 μM AAP; Legende s.Abb.3

Tab.16: Hyperosmolare Schädigung der Mukosae durch lumenseitige Vorinkubation mit 2 Osmol Na-Cyclamat und Verteilung von AAP und Ac-AAP an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums nach lumen- oder blutseitigem Angebot von 100 μ M AAP; alle Angaben in Prozent der eingesetzten Menge (=100 %)

	Lumen		Mukosa		Blut	
	AAP	Ac-AAP	AAP	Ac-AAP	AAP	Ac-AAP
Kontrolle						
Angebot Lumen:						
	42,23	36,35	n.d.	4,293	1,950	15,12
S.E.M.	1,69	2,25		0,107	0,250	2,05
N	5	5	6	6	6	6
Angebot Blut :						
	1,264	16,08	0,441	3,712	60,05	18,46
S.E.M.	0,255	0,27	0,058	0,128	1,84	1,22
N	8	6	8	8	8	8
hyperosmolare Schädigung der Lumenseite						
Angebot Lumen:						
	71,52	6,616	2,484	2,462	6,104	10,82
S.E.M.	0,07	0,991	0,312	0,056	0,100	2,77
N	2	2	2	2	2	2
Angebot Blut :						
	11,18	5,473	1,584	2,795	65,78	13,19
S.E.M.	0,76	0,675	0,326	0,652	4,66	1,50
N	4	4	4	4	4	4

Die Gesamtmetabolisierungsrate ist unter Einfluß der hyperosmolaren Vorinkubation nach lumenseitigem Substratangebot mit 19,90 % acetyliertem Substrat gegenüber 55,76 % der mitgeführten Kontrollen deutlich herabgesetzt. Im Gegensatz zu den Versuchen mit PABA ist beim AAP auch die Metabolisierungsrate nach blutseitigem Angebot des Substrates mit 21,46 % in der hyperosmolaren gegenüber 38,25 % in der Kontrollbedingung beeinflusst. Dieser Befund ergibt sich überwiegend aus einer Verminderung der zur Lumenseite abgegebenen Menge an acetyliertem Substrat. Die auf der Lumenseite aufgefundene Menge an Ac-AAP beträgt dabei nach lumenseitiger Gabe das 0,18fache, nach blutseitiger Gabe das 0,34fache der Kontrolle (Abb.14,Tab.16). Der Anteil an acetyliertem Substrat in der lumenseitigen Inkubationslösung ist damit im Gegensatz zu den Kontrollen unabhängig von der Angebotsseite gleich. Ebenfalls unabhängig von der Angebotsseite, wird nach einer hyperosmolaren Schädigung

der überwiegende Anteil der acetylierten Verbindung zur Blutseite abgegeben (Tab.17). Der Anteil an acetyliertem Substrat im Gewebe und, in geringerem Ausmaß, in der blutseitigen Inkubationslösung, ist bei einem lumenseitigen osmotischen Schock reduziert (Abb.14). Bezieht man den Anteil an acetyliertem Substrat jedoch nicht auf die insgesamt eingesetzte Menge an AAP, sondern relativ auf die konjugierte Menge an Substanz, so ist der Anteil im Gewebe erhöht (Tab.17). Deutlich erhöht ist auch der im Gewebe und in den jeweiligen Gegenseiten aufzufindende Anteil an nicht umgesetztem Substrat.

Tab.17: Hyperosmolare Vorinkubation und relative Verteilung von Ac-AAP (=100 %) am Meerschwein-Jejunum

	Angebotsseite Lumen			Angebotsseite Blut		
	Lumen	Mukosa	Blut	Lumen	Mukosa	Blut
Kontrollen						
	65,19	7,699	27,11	42,04	9,704	48,26
SEM	3,03	0,192	3,68	0,71	0,335	3,19
N	5	6	6	8	8	8
Na ⁺ -Cyclamat						
	33,25	12,37	54,38	25,51	13,03	61,47
SEM	4,98	0,28	13,92	3,15	3,04	6,99
N	2	2	2	4	4	4

3.2.3. Verteilung von Substrat und Metabolit am Colon des Meerschweinchens

Die Gesamtmetabolisierungsrate von AAP an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Colons ist der des PABA vergleichbar. Nach blutseitiger Gabe des AAP wurde dabei mit einem Anteil von 32,46 % der eingesetzten Menge mehr Ac-AAP gebildet als nach lumenseitigem Substratangebot mit 26,56 %. Neben dem Metaboliten Ac-AAP kann, wie am Jejunum, in allen Kompartimenten ein Anteil an nicht konjugiertem AAP bestimmt werden (Abb.13,Tab.14). Dieser Anteil ist im Gewebe sehr viel kleiner, in den Inkubationslösungen der Gegenseite größer als der in diesen Räumen bestimmte Anteil an Ac-AAP.

Tab.18: Relative Verteilung von Ac-AAP (=100 %) am Meerschweinchen-Colon

	Angebotsseite Lumen			Angebotsseite Blut		
	Lumen	Mukosa	Blut	Lumen	Mukosa	Blut
100 μ M	53,09	4,842	42,06	45,07	4,137	50,80
SEM	3,43	0,794	2,97	1,45	0,360	4,71
N	6	6	6	7	7	7

Ac-AAP verteilt sich zwischen der Blut- und Lumenseite immer mit einer leichten Bevorzugung der Angebotsseite, das heißt nach lumenseitigem Angebot zur Lumenseite und nach blutseitigem Angebot zur Blutseite (Tab.18). Diese Verteilung läßt sich nach lumenseitigem Angebot als schwach signifikant, nach blutseitigem Angebot jedoch nicht statistisch belegen. Die zur jeweiligen Gegenseite abgegebene Menge an Metabolit (Abb.13) ist nach blutseitigem Substratangebot signifikant höher als nach lumenseitigem Angebot. Der in den Inkubaten der Gegenseiten bestimmte hohe Anteil an nicht umgesetztem AAP ist dagegen -unabhängig von der Seite des Substratangebotes- gleich.

3.3. in vivo Perfusion

Im Rahmen der Untersuchung des Permeationsmechanismus und der Metabolisierung von PABA wurden überwiegend Untersuchungen am Modell der isolierten Mukosa durchgeführt. Um die dabei erhobenen Befunde auch in situ zu überprüfen, wurde ein einfaches Modell der in vivo-Perfusion eingeführt.

3.3.1. Versuche am Meerschweinchen-Jejunum

Im Perfusionsexperiment wurde ein Darmabschnitt des proximalen Jejunums von 15 cm Länge mit 10 μ M PABA in einem Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer perfundiert. Bei Perfusionsbeginn kam es durch die noch im Darmlumen vorhandene Flüssigkeit zu einer deutlichen Verdünnung der Perfusionslösung. Nach 15 min Perfusion verblieb die Konzentration, berechnet als Summe aus Substrat und Metabolit

im Darmlumen, in einem Bereich zwischen 8,4 und 8,1 μM stabil. Aus dem am Versuchsbeginn eingesetzten Volumen von 6 ml Perfusionslösung und der Summe des rückgewonnen Perfusates von 6,203 ml errechnet sich eine Enterosorption von 13,5 $\mu\text{l/h}$ und cm Darm. In der Perfusion wird nur wenig Substanz resorbiert; im Zeitraum zwischen 15 min und 60 min nach Perfusionsbeginn entspricht die Resorptionsrate einer Konzentrationsänderung der Summe des Tracers von 0,275 μM oder einer resorbierten Menge von insgesamt 1,65 nmol.

Wesentlich deutlicher als in der Konzentration veränderte sich die Verteilung des Tracers auf PABA und Ac-PABA in der luminalen Perfusionslösung. Dabei stieg im Lumen der Anteil an acetyliertem PABA über die Versuchszeit kontinuierlich an, während parallel der Anteil an nicht umgesetztem PABA zurückging (Abb.15). Am Versuchsende liegt dabei Ac-PABA in einer Konzentration von 2,55 μM mit

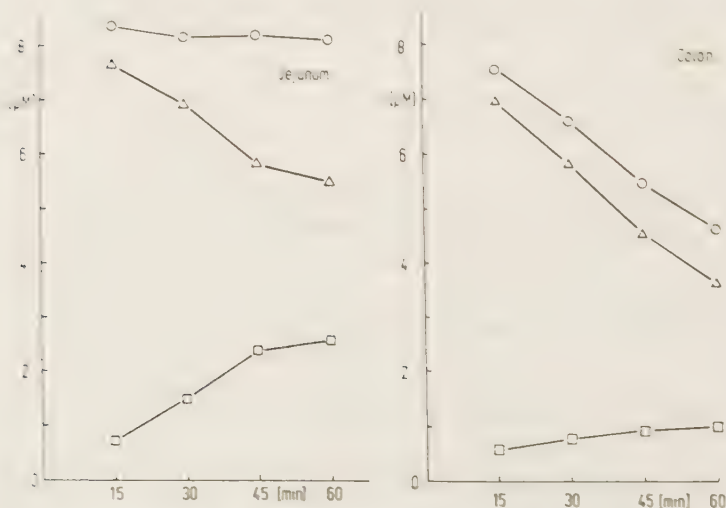


Abb.15 : In vivo Perfusion des Meerschweinchen-Jejunums (links) und Meerschweinchen-Colons (rechts) mit oxygenierter Perfusionslösung. Konzentration von PABA (Dreiecke), Ac-PABA (Quadrate) und der Summe beider Verbindungen (Kreise) im luminalen Perfusat.

einem Anteil von 31,5 % des Tracers im Lumen vor. Damit stehen der zwischen 15 und 60 min resorbierten Menge an Tracer von 1,65 nmol 11,04 nmol im gleichen Zeitraum in das Lumen abgegebenes Ac-PABA gegenüber.

Der am Versuchsende im Plasma und in der Mukosa bestimmte Tracer wurde ausschließlich von Ac-PABA repräsentiert. Die hier bestimmten absoluten Anteile waren dabei, bezogen auf die eingesetzte Menge an Substrat, mit 0,58 % im Plasma (angenommenes Blutvolumen 1/13 des Tiergewichtes, Rummel und Seifen, 1964) und 0,55 % in der Mukosa sehr gering. Für das Plasma entspricht dies einer Konzentration des Ac-PABA von 0,076 μ M. Korrigiert man das Feuchtgewicht der Mukosa auf den extrazellulären Raum (angesetzt mit 25 %, s.a. Kap. 5.1.1.), ergibt sich eine intrazelluläre Konzentration von 0,377 μ M. Die Gesamtausbeute, errechnet aus Tracer im Lumen, Plasma, Gewebe und in der Spüllösung, war 91,5 % der am Versuchsbeginn eingesetzten Aktivität.

3.3.2. Versuche am Meerschweinchen-Colon

Am Meerschweinchen-Colon wurden zwei Versuche der in vivo Perfusion durchgeführt. In einem der Versuche wurde, wie im Versuch am Meerschweinchen-Jejunum, die Perfusionslösung über den Versuchszeitraum mit Sauerstoff oxygeniert (A). Der pH-Wert der Perfusionslösung wurde über den gesamten Versuchszeitraum mit einer Einstabmeßkette in dem auf 37°C temperierten Vorratsgefäß bestimmt. In einem anderen Versuch wurde die Perfusionslösung über den Versuchszeitraum anaerob gehalten (B) und die Oberfläche des Vorratsgefäßes mit Paraffinöl überschichtet. Um eine Verschmutzung der Glasmembran der Einstabmeßkette zu vermeiden, wurde in diesem Fall der pH-Wert der Perfusionslösung nicht im Vorratsgefäß, sondern in den entnommenen Proben nach Versuchsende bestimmt. Aufgrund der unterschiedlichen Methodik sind die Ergebnisse beider pH-Wert Bestimmungen nicht direkt vergleichbar.

Perfundiert wurde ein Darmabschnitt von 10 cm des proximalen Colons mit einem eingesetzten Volumen von 8 ml (A) und 9 ml (B) Perfusionslösung. Am Versuchsende konnte ein Volumen von 7,67 ml (A) und 8,39 ml (B) zurückgewonnen werden; daraus errechnet sich eine Flüssigkeit-Resorptionsquote von 33 μ l pro h und cm (A) und 61,4 μ l pro h und cm Darm (B).

Über den Versuchszeitraum von 60 min kam es in der lumenseitigen Perfusionslösung zu einer deutlichen Verschiebung des pH-Wertes von 6,95 (A) und 6,75 (B) in den sauren Bereich auf einen Wert von 5,97 (A) und 5,00 (B) (Abb.16). Damit läßt sich eine lumenseitige Ansäuerung auch in vivo und, darüberhinaus, unabhängig von der

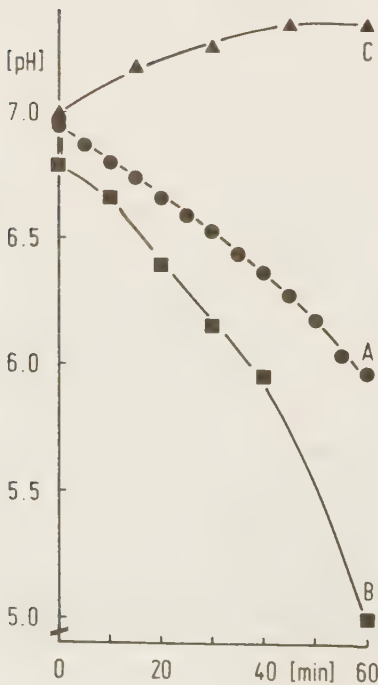


Abb.16 :
pH-Wert der Perfusionslösung bei
rezirkulierender Perfusion am
Colon A,B: proximales Meerschwein-
chen-Colon A: Perfusat oxygeniert
B: Perfusat anaerob, C: proximales
Ratten-Colon, Perfusat anaerob

Oxygenierung der Lumenseite nachweisen. Der besonders deutliche Abfall des luminalen pH-Wertes, in der anaeroben Versuchsbedingung zwischen 40 und 60 min, erklärt sich aus der nur noch geringen Pufferkapazität des Tris-Mediums in diesem pH-Wertebereich (vgl. auch Kapitel 2.2.2., Abb.1).

PABA wurde in der Perfusionslösung in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt. Wie im Versuch am Jejunum kam es bei Perfusionsbeginn zu einer deutlichen Verdünnung des Perfusates über im Darm verbliebene Flüssigkeit. Während der rezirkulierenden Perfusion kam es zu einer erheblichen Elimination von PABA aus dem Perfusat (Abb.15,Abb17). Dabei verminderte sich bei der aeroben Perfusion zwischen 15 und 60 min die Konzentration des einge-

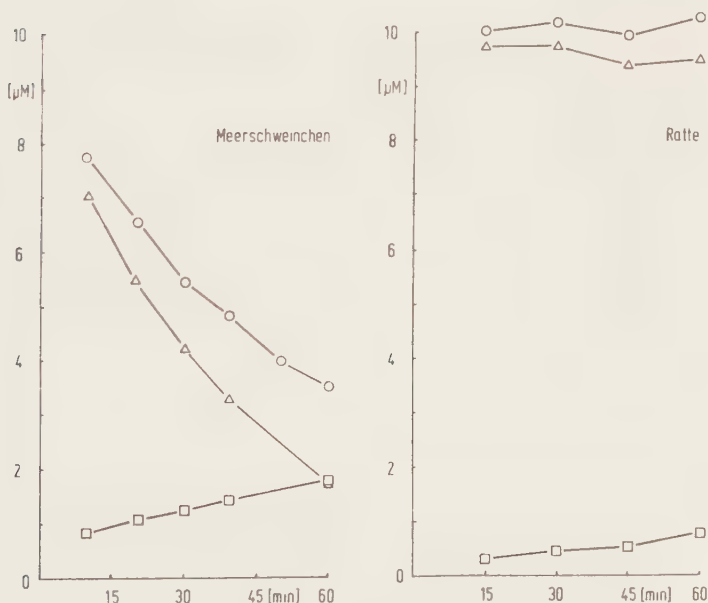


Abb.17 : In vivo Perfusion des Meerschweinchen-Colons (links) und Ratten-Colons (rechts) mit nicht oxygenierter Perfusionslösung; Konzentration von PABA (Dreiecke), Ac-PABA (Quadrate) und der Summe beider Verbindungen (Kreise) im luminalen Perfusat

setzten Tracers von 7,57 μM auf 4,61 μM und bei der anaeroben Perfusion zwischen 10 und 60 min von 7,92 μM auf 3,55 μM . Parallel hierzu ließ sich am Versuchsende ein großer Anteil an Tracer im Plasma der Tiere bestimmen. Die hier zu bestimmende Aktivität setzt sich ausschließlich aus der acetylierten Verbindung zusammen. Bezogen auf die am Versuchsbeginn eingesetzte Menge an PABA fanden sich dabei 11,2 % (A) und 20,3 % (B) Ac-PABA im Plasma (angenommenes Blutvolumen 1/13 des Tiergewichtes, Rummel und Seifen, 1964). Als Plasma-Konzentrationen des Ac-PABA wurden 0,172 μM (A) und 0,440 μM (B) bestimmt.

Die Abgabe von acetyliertem Substrat zurück in das Darmlumen ist im Bereich des Colons deutlich geringer als am Jejunum (Abb.15). Der Abnahme der Konzentration des Tracers im Perfusat zwischen 15 und 60 min von 2,95 μM (A) und zwischen 10 und 60 min von 4,37 μM (B) steht dabei eine Zunahme der Ac-PABA Konzentration von 0,39 μM (A) und 0,95 μM (B) im gleichen Zeitraum gegenüber. Am Versuchsende fand sich Ac-PABA in einer Konzentration von 1,00 μM mit einem relativen Anteil von 21,4 % (A), und 1,80 μM , relativer Anteil 50,5 % (B), im Perfusat. Im Gewebe fand sich, bezogen auf die eingesetzte Menge an PABA am Versuchsbeginn, ein Anteil von 0,15 % (A) und 0,36 % (B). Nach Korrektur der Feuchtgewichte auf den ER (angesetzt mit 55 %, s.a. 7.1) läßt sich daraus eine Konzentration von 0,74 μM (A) und 1,49 μM (B) errechnen. Als Gesamtausbeute des rückgewonnenen Tracers ergaben sich 74,2 % (A) und 68,4 % (B) der eingesetzten Aktivität.

3.3.3. Versuche am Ratten-Colon

In einem Versuch wurde ein Abschnitt des proximalen Ratten-Colons von 10 cm mit 10 ml einer 10 μM PABA enthaltenden Lösung anaerob perfundiert. Aus dem eingesetzten Volumen und den zurückgewonnenen 7,27 ml ergibt sich eine Flüssigkeitsresorption von 273 μl pro h und cm Darm. Anders als beim Meerschweinchen kam es bei der Ratte zu keiner Verdünnung des Perfusates bei Perfusionsbeginn.

Der pH-Wert des luminalen Perfusates veränderte sich über den Zeitraum der Perfusion nicht in den sauren Bereich (Abb.16). Statt dessen konnte bei einem pH-Wert von 7,00 am Versuchsbeginn eine leichte Alkalisierung des Mediums auf einen pH-Wert von 7,33 nach 45 min Perfusion beobachtet werden. Im weiteren Inkubationsverlauf blieb der pH-Wert konstant.

Eine Konzentrationsänderung konnte für PABA im Perfusat nicht beobachtet werden (Abb.17). Damit wird die Säure parallel zu der resorbierten Flüssigkeit in einem mengenmäßigen Anteil von 30,3 % der eingesetzten Aktivität aus dem Darmlumen aufgenommen. Der einzige Metabolit in der Perfusionslösung und in der Mukosa war Ac-PABA. Die Sekretion an acetylierter Substanz war mit einer Endkonzentration des Ac-PABA von 0,77 μM im Perfusat geringer als im Meerschweinchen-Colon (Abb.17).

Bezogen auf die zu Versuchsbeginn eingesetzte Menge fand sich am Versuchsende ein Anteil von 4,5 % im Plasma (Blutvolumen 1/13 des Tiergewichtes, Rummel und Seifen, 1964). Dabei fand sich neben Ac-PABA eine weitere, radioaktiv markierte Verbindung in einem relativen Anteil von 18,9 %. Eine Co-Chromatographie mit acetylierter Hippursäure ergab einen identischen Rf-Wert von 0,08. Damit ergibt sich für das Ac-PABA im Plasma eine Konzentration von 0,097 μM und für Ac-PAH eine Konzentration von 0,023 μM . In der Mukosa kann mit 0,32 % des am Versuchsbeginn eingesetzten Tracers unter Einrechnung des korrigierten Feuchtgewichtes (geschätzter ER = 55 %) eine Gewebekonzentration von 1,06 μM errechnet werden. Als Rate der Gesamtausbeute konnten 81 % des eingesetzten Tracers bestimmt werden.

4. Diskussion der Metabolisierungsstudien

4.1. Metabolisierung von PABA und AAP am Jejunum und Colon

4.1.1. N-Acetylierung des PABA

Der prinzipielle Metabolit der p-Aminobenzoesäure (PABA) an der isolierten Mukosa des Dün- und Dickdarmes des Menschen und des Meerschweinchens ist die N-Acetyl-p-aminobenzoesäure (Ac-PABA). Diese Konjugationsreaktion erweist sich an der isolierten Meerschweinchen-Mukosa als sättigungsfähige Reaktion; mit steigender Konzentration an angebotenem PABA findet sich ein steigender Anteil an nicht umgesetztem PABA im Enterocyten. Dieser Befund belegt, daß eine Einschränkung der Konjugation über eine Substratsättigung der Enzymreaktion im Enterocyten und nicht primär über eine Sättigung des Aufnahmeschrittes von PABA in das Gewebe hinein bewirkt wird. Der hohe Anteil an acetyliertem Substrat bei der Angebotskonzentration von 20 μ M spricht für einen ausgeprägten first-pass Metabolismus dieser Verbindung.

Weitere Metaboliten des PABA konnten in den Versuchen, in denen ausschließlich PABA eingesetzt wurde, weder in den Inkubaten mit humanem Gewebe noch beim Meerschweinchen identifiziert werden. Systemisch läßt sich auch in den in situ-Versuchen am Meerschweinchen-Jejunum und Colon in der Mukosa wie im Plasma der Versuchstiere kein anderer Metabolit als Ac-PABA nachweisen. Im Perfusat und in der Mukosa des Ratten-Colons fand sich ebenfalls nur Ac-PABA als Metabolit. Im Plasma der Ratte konnte dagegen als zweiter Metabolit das N-acetylierte Derivat der p-Aminohippursäure (Ac-PAH) identifiziert werden.

Die Metabolisierung von PABA ist in der Vergangenheit intensiv untersucht worden. Schon 1914 beschrieben Ellinger und Henzel N-Acetyl-PABA als Metabolit des PABA beim Kaninchen. Die Fähigkeit zur Acetylierung von PABA konnte auch beim Menschen (Sherwin, 1924, Bernhard, 1940, Zehender, 1943), beim Meerschweinchen (Zehender, 1943) und bei der Ratte (Riggs und Christensen, 1951)

beschrieben werden. Als bisher einzige bekannte Spezies fehlt dem Hund die Fähigkeit zur Acetylierung aromatischer Amine (Sherwin, 1924). Nach oraler Gabe konnten als weitere Metaboliten des PABA das Glycin-Konjugat der Säuregruppe, p-Aminohippursäure (PAH), das Glukuronid der Säuregruppe und die acetylierten Derivate beider Verbindungen beim Menschen (Koivusalo und Mitarbeiter, 1959), beim Kaninchen (Bray und Mitarbeiter, 1948), bei der Ratte (Koivusalo und Mitarbeiter, 1958, Yamato und Kinoshita, 1978) und beim Meerschweinchen (Yamato und Kinoshita, 1978) nachgewiesen werden. Ein in der 3-Position ringhydroxyliertes Derivat der Säure wurde bisher nur von einem Autor (Bray und Mitarbeitern, 1948) am Kaninchen beschrieben.

Mechanismen der Acetylierung aromatischer Amine können polymorph vererbt werden. Für PABA ist diese Polymorphie, im Vergleich zu anderen Verbindungen wie Isoniazid oder 2-Aminofluoren beim Kaninchen (Hein und Mitarbeiter, 1982) und beim Hamster (Hein und Mitarbeiter, 1985), nur schwach ausgebildet. Eine genetisch bedingte unterschiedlich starke Acetylierung des PABA konnte für den Menschen nicht belegt werden (Evans und White, 1964). In einer Studie mit homozygot schnellen und langsamen Acetylierern beim Kaninchen konnte am Duodenum im Gegensatz zur Leber keine polymorphe Verteilung der Acetylierung von PABA festgestellt werden (Hearse und Weber, 1973). Ausführliche Beschreibungen der genetischen Variabilität und des molekularen Mechanismus der Acetylierung finden sich in Übersichten von Weber (Weber, 1971, Weber und Mitarbeiter, 1980, Weber und Hein, 1985).

Die in der vorliegenden Untersuchung zwischen Meerschweinchen und Ratte sichtbar gewordene Spezies-Differenz im Metabolismus von PABA findet sich bereits in der Literatur beschrieben. In einer Studie von Yamato und Kinoshita (1978) wurden Ratten und Meerschweinchen oral 10 mg/kg Bz-ty-¹⁴C-PABA gegeben. Diese als ein Testpeptid der Pankreasfunktion eingesetzte Verbindung (Bentiro-mid-Test) wird bei ausreichender Enzymsekretion des Pankreas im Darm annähernd vollständig gespalten und PABA in den Körper der Versuchstiere aufgenommen. Im Urin der Tiere fand sich Ac-PABA

beim Meerschweinchen mit einem relativen Anteil von 92 % und Ac-PAH mit einem Anteil von 3 % der insgesamt ausgeschiedenen Aktivität. Bei den Experimenten an der Ratte wurde dagegen 68 % als Ac-PABA und 28,5 % als Ac-PAH ausgeschieden (berechnet auf 100 % Ausbeute nach Yamato und Kinoshita, 1978).

Verglichen mit anderen Organsystemen des Körpers wie Niere oder Leber findet sich für PABA beim Kaninchen die höchste totale Acetylierungskapazität in der Darmmukosa (Hearse und Weber, 1973). Beim Menschen ist die Kapazität zur Acetylierung von PABA in Darm und Leber gleich (Pacifici und Mitarbeiter, 1986). Hartiala und Terho (1965) beschreiben eine ebenfalls vergleichbare Kapazität der Acetylierung von Sulphanilamid zwischen Duodenum, Ileum und Leber des Meerschweinchens. Ein first-pass Metabolismus von PABA in der Darmmukosa konnte 1950 von Blondheim und Kunkel beim Menschen über eine Analyse des Gehaltes an PABA und Ac-PABA in der portalen kollateralen Vene und in einer peripheren Vene nach einem lumenseitigem Angebot der Säure beschrieben werden.

4.1.2. Anteil der Glycin-Konjugation am Metabolismus von PABA

Ac-PABA ist in den Versuchen, die der physiologischen Bedingung am nächsten stehen (Sauerstoffbegasung, kein Inhibitor), im mukosalen Gewebe der einzige bestimmbare Metabolit des PABA. Dieses Ergebnis steht damit in guter Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Yasuhara und Mitarbeitern (1977), die Ac-PABA als alleinigen Metaboliten des PABA am Jejunum und Colon der Ratte beschreiben. Wie auch vergleichbare Untersuchungen anderer Autoren zeigen, tritt neben der hohen Kapazität des Darmes zur Acetylierung aromatischer Amine seine Fähigkeit zur Konjugation mit Glycin an der Carboxylgruppe deutlich zurück. Hauptsyntheseorte von PAH als Metabolit des PABA sind die Leber und die Niere. Im Gewebe des Dünndarms der Ratte findet sich für diese Umsetzungsreaktion im Vergleich nur 5 % der Aktivität der Leber und nur 2 % der Aktivität der Niere (berechnet nach Irjala, 1972). Die Kapazität der Glycin-Konjugation von PABA ist beim Meerschweinchen geringer als bei der Ratte.

Im Vergleich beider Arten findet sich dabei beim Meerschweinchen nur 67,8 % (Leber) und 27,3 % (Niere) der Konjugationskapazität (Irjala, 1972). Gegenüber der Umsetzungs-Kapazität von Niere und Leber tritt auch beim Meerschweinchen die Glycin-Konjugation des Darmes zurück.

Auf der Grundlage der Daten von Irjala (1972) läßt sich ein maximal in dem Versuchssystem zu erwartender Anteil an PAH abschätzen. Dabei errechnet sich bei einer Angebotskonzentration von 1 mM PABA, das vollständig den metabolisierenden Raum erreicht, 6,6nmol PAH oder 3,3 % der eingesetzten Menge. Sollte, wie bei der Ratte, die Konjugationskapazität des Jejunums geringer als die des Duodenums sein, so reduziert sich dieser Betrag auf ein Drittel seines Wertes. Zieht man weiterhin in Betracht, daß nicht das gesamte Substrat den metabolisierenden Raum erreichen kann und das PAH auch zu Ac-PAH umgesetzt wird, so könnte die gebildete Menge an PAH und Ac-PAH einem Betrag unterhalb der Erfassungsgrenze entsprechen.

4.1.3. weitere Metaboliten des PABA

In den Versuchen mit einer Vorinkubation der Mukosae mit EDTA und Cellobiose (Meerschweinchen-Jejunum) und in den Versuchen mit einer Inkubation der Mukosae mit Inkubationslösungen, die die Inhibitoren SITS oder PBA enthielten (Meerschweinchen-Colon), treten in der Chromatographie der Inkubationslösungen neue und unbekannte Umsetzungsprodukte des PABA auf. In den beiden letzten Fällen treten diese Verbindungen nur in den Inkubaten der Angebotsseiten bei gleichzeitiger Gabe des Inhibitors und des Substrates auf und sind damit mit großer Wahrscheinlichkeit ein Reaktionsprodukt aus einer chemischen Umsetzung der Agenzien mit PABA.

Anders liegen die Verhältnisse am Jejunum. Hier wurden Cellobiose und EDTA vor Inkubationsbeginn aus der Kammer entfernt und die Kammervolumina zweimal sorgfältig gespült. Darüberhinaus finden sich die neuen Verbindungen sowohl auf der Angebotsseite wie in

der Mukosa und, im Falle des EDTA, im Inkubat der Gegenseite. Die unter Einfluß des EDTA und der Cellobiose auftretenden neuen Metaboliten sind nicht miteinander identisch.

4.1.4. N-Acetylierung des Aminoacetophenons

PABA ist, wie sein Metabolit Ac-PABA, eine im physiologischen pH-Wertebereich sehr polare Verbindung. Um die Metabolisierung und die Metabolitenabgabe einer lipophileren und nicht aciden, aber sonst strukturell sehr ähnlichen Verbindung zu untersuchen, wurde p-Aminoacetophenon (AAP) am Meerschweinchen-Jejunum und Colon eingesetzt. Mit einem pK_a von 2,19 (25°C, Perrin, 1965) liegt AAP bei dem eingesetzten pH-Wert annähernd vollständig nicht protoniert, d.h. in Form der freien Base, vor. AAP wird, wie PABA, über eine N-Acetylierung seiner Aminogruppe metabolisiert; der Hauptmetabolit dieser Verbindung ist am Jejunum wie am Colon N-Acetyl-p-aminoacetophenon (Ac-AAP). Aus der Literatur liegen keine Untersuchungen zur Metabolisierung von AAP nach systemischer Gabe oder an Einzelorganen vor. Die prinzipielle Fähigkeit einer Arylamin-Acetyltransferase zur Acetylierung dieser Verbindung konnte dagegen von Riddle und Jencks (1971) nachgewiesen werden.

AAP ist, da im Handel nicht radioaktiv markiert erhältlich, wie sein Metabolit über eine Methode der Hochdrucksäulenchromatographie bestimmt worden. Diese Bestimmungsmethode hatte den Vorteil, daß die Konzentrationen von AAP und Ac-AAP direkt anhand von Vergleichsstandards bestimmt werden konnten. Nachteilig ist jedoch, daß eine Existenz von weiteren Metaboliten nicht ausgeschlossen werden kann. So ist es möglich, daß diese Verbindungen bei der eingesetzten Wellenlänge des Detektors von 297 nm keine ausreichende Extinktion aufweisen. Weiterhin wäre es denkbar, daß diese Metaboliten trotz ausreichender Extinktion gleichzeitig zu der starken Extinktionsänderung im Frontbereich eluiert werden und sich aus diesem Grunde einer Analyse entziehen.

Ein Hinweis auf die Existenz eines oder mehrerer solcher Metaboliten könnte sich aus der unvollständigen Gesamtausbeute (recovery) ergeben. Aus diesem Fehlbetrag kann ein Anteil dieser Umsetzungsprodukte von maximal 4-15 %, abhängig von dem Darmabschnitt und von der Angebotsseite, geschätzt werden.

4.2. Verteilung der Metaboliten von PABA und AAP am Jejunum

4.2.1. Verteilung zur lumen- und blutseitigen Inkubationslösung

Nach einseitigem Substratangebot am Präparat der isolierten Mukosa des Jejunums wurde die Abgabe der Metaboliten in die lumen- und blutseitige Inkubationslösung untersucht. Die dabei auftretende Verteilung auf beide Seiten zeigt in allen Fällen eine Abhängigkeit von der Seite des Substratangebotes. Ac-PABA wird am Jejunum von Meerschweinchen und Mensch annähernd vollständig in die Inkubationslösung der Angebotsseite zurücksezerniert. Auch beim AAP ist die Verteilung des Metaboliten Ac-AAP abhängig von der Seite des Substratangebotes; ein von der Angebotsseite abhängiges Verteilungsmuster ist damit nicht an saure Konjugate gebunden. Dabei ist das Verteilungsmuster des Metaboliten jedoch anders als das des Ac-PABA; es findet sich aufgrund des apolaren Charakters mehr Metabolit in den Inkubaten der Gegenseite. Bei blutseitiger Gabe wird der Metabolit in etwa gleichen Anteilen in die lumen- wie blutseitige Inkubationslösung abgegeben. Nach lumenseitiger Gabe erscheint dagegen mehr als doppelt soviel Metabolit auf der Angebots- wie auf der Gegenseite.

4.2.2. Verteilung anderer Metabolite an der isolierten Mukosa

Eine von der Angebotsseite des Substrates abhängige Verteilung der Metaboliten an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums konnte von anderen Autoren für Konjugations-Reaktionen der Glukuronidierung und Sulfatierung aromatischer Phenole wie auch bei der Demethylierung des Herzglykosides Cymarol, also bei einer Phase I

Reaktion, beobachtet werden. Vergleichbar zur Verteilung von Ac-FABA ist dabei die Abgabe der Glukuronide des 1-Naphthols (Sund und Lauterbach, 1985), des Oestradiols (Schorn, 1986) und des p-Nitrophenols (Fries, 1986). Für die Abgabe der Glukuronide aus dem Enterocyten werden von den Autoren Carriermechanismen in der luminalen wie auch in der basolateralen Membran diskutiert.

Die Abgabe des sulfatierten Konjugates des 1-Naphthols (Sund und Lauterbach, 1985) an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums ist ebenfalls nicht unabhängig von der Angebotsseite des Substrates. Hier verteilen sich die Metabolite nach serosalem Angebot in gleichen Anteilen in beide Inkubationsmedien. Bei lumen-seitigem Angebot findet sich der größte Anteil an Metabolit in der Inkubationslösung der Angebotsseite. Für das sulfatierte p-Nitrophenol kann im Bereich einer niedrigen Angebotskonzentration von 10 μ M eine ähnliche Verteilung beobachtet werden (Fries, 1986).

Cymarol wird von der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums und Ileums über eine Demethylierung des Zuckers Cymarose zu Helveticosol umgesetzt. Die von der Angebotsseite des Cymarols abhängige Verteilung des Helveticosols zur Lumen- und Blutseite gleicht dabei der Verteilung des acetylierten AAP: nach lumen-seitiger Gabe erscheint der Metabolit überwiegend im Angebotsmedium, verteilt sich jedoch bei blutseitiger Gabe in etwa gleichen Anteilen zu beiden Seiten.

Mit der Acetylierungsreaktion kann diesen Befunden einer von der Angebotsseite abhängigen Verteilung der Metaboliten ein weiterer Reaktionstyp des enteralen Metabolismus von Xenobiotika hinzugefügt werden. Bei einem Vergleich der bisher untersuchten Metabolisierungsreaktionen an der isolierten Mukosa des Jejunums lassen sich folgende Übereinstimmungen beobachten:

- (1) Eine von der Angebotsseite des Substrates unabhängige Abgabe eines Metaboliten zur Lumen- oder Blutseite konnte am Modell der isolierten Mukosa des Jejunums in keinem Fall beobachtet werden. Durch die Vielzahl und Unterschiedlichkeit der unter-

suchten Reaktionstypen scheint die beobachtete Verteilung der N-acetylierten Metabolite ein generelles Phänomen der Metabolitenabgabe am Dünndarm widerzuspiegeln.

- (2) Die beobachteten Verteilungen sind unabhängig von einer spezifischen zellulären Lokalisation der metabolisierenden Enzyme. Die Acetylierung und die Sulfatierungsreaktion werden im Gewebe über cytosolische Enzyme vermittelt (Hearse und Weber, 1973, Dawson und Bridges, 1981). Das Enzymsystem der Glukuronyltransferasen findet sich gebunden an den Membranen der Nuklei, der Mitochondrien und in der mikrosomalen Fraktion, jedoch nicht im partikelfreien Überstand (Koster und Mitarbeiter, 1985). Die O-Desalkylierung ist an mikrosomale Enzyme gebunden (Gram, 1971).
- (3) Für das auftretende Verteilungsmuster scheint nicht die Polarität der Ausgangsverbindung, sondern die Polarität des Metaboliten von Bedeutung zu sein. Zwischen PABA und den phenolischen Verbindungen bestehen deutliche Unterschiede in den chemisch-physikalischen Eigenschaften der Ausgangssubstrate: während p-Nitrophenol, Oestradiol und 1-Naphthol selbst relativ apolar sind, haben die Glukuronide einen sehr sauren Charakter. PABA und Ac-PABA sind dagegen Säuren und damit, bei physiologischen pH-Werten, beide sehr polare Substanzen.
- (4) Die bei blutseitigem Angebot der Substrate beobachteten Verteilungsmuster lassen sich zwei Typen zuordnen: (A) Ac-PABA und die Glukuronide werden fast vollständig zur Angebotsseite, (B) Ac-AAP und Helveticosol dagegen zu etwa gleichen Teilen zu beiden Seiten abgegeben. Mit der Acetylierung von PABA und AAP können hier zum ersten Mal beide Verteilungsmuster bei einer Metabolisierungsreaktion beobachtet werden. Im Vergleich ergibt sich eine Parallele zwischen der Polarität der Metaboliten und dem aufgetretenen Typus: Während die sehr polaren Glukuronide und Ac-PABA dem Typ (A) entsprechen, lassen sich die bedeutend lipophileren Metabolite Ac-AAP und Helveticosol dem Typ (B) zuordnen.

4.2.3. Verteilung von Ac-PABA in situ

Ein Argument gegen die physiologische Signifikanz der beobachteten Verteilung des Metaboliten von PABA ergibt sich zwangsläufig aus dem eingesetzten Versuchssystem der isolierten Mukosa. Um hier ein Artefakt aus dem methodischen Ansatz ausschließen zu können, wurde daher ein einfaches Modell einer in situ-Perfusion des Darmlumens eingeführt und PABA in diesem Ansatz lumenseitig angeboten. Bei der Perfusion des Darmlumens wird im Jejunum nur wenig Tracer aus dem Perfusat eliminiert; im Plasma und in der Mukosa findet sich dabei ausschließlich Ac-PABA. Dagegen wird ein prozentual großer Anteil des PABA konjugiert und das gebildete Ac-PABA wieder in das Lumen abgegeben. Insgesamt überstieg die so von der Mukosa in das Lumen abgegebene Menge an Metabolit die aus dem Lumen eliminierte Menge an Tracer um das 7fache (in vitro um das 15fache). Bezieht man die Unterschiede in der Methodik -Konzentration des Substrates, Inkubationszeit, Verhältnis des Volumens der Inkubationslösung/Oberfläche etc.- mit in den Vergleich ein, ergibt sich damit eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des in situ-Versuches und den in vitro-Experimenten.

Eine lumenseitige Abgabe des Metaboliten von PABA wurde von auch von Yasuhara und Mitarbeitern (1984) an abgebundenen Schlingen des Ratten-Jejunums beobachtet. Bei einer Instillation eines Phosphat-Puffers (pH 6,5) mit 100 μ M PABA kam es dabei innerhalb von 5 min zu einer Elimination von 50,6% des eingesetzten Substrates aus dem Lumen. 39,3% dieser resorbierten Menge wurden als Ac-PABA in das Lumen zurücksezerniert. Im Gegensatz zum Meerschweinchen wird damit PABA bei der Ratte sehr gut resorbiert; die hohe Resorptionsquote und eine damit verbundene Sättigung eines lumenseitigen Abgabemechanismus könnte auch die Ursache der höheren Abgabe zur Blutseite sein. Nach intravenöser Gabe von 100 μ mol/kg PABA fand sich dagegen nach 30 min nur 4,02% der Dosis als Ac-PABA im Darmlumen.

4.2.4. Mechanismus der von der Angebotsseite abhängigen Verteilung von Metabolisierungsprodukten

Als Grundlage des Phänomens der von der Angebotsseite abhängigen Verteilung von Metabolisierungsprodukten wird von Sund und Lauterbach (1985) eine Kompartimentierung der Mukosa in zwei unterschiedliche metabolisierende Räume diskutiert. Mit der vorliegenden Untersuchung kann nun auch auf eine Kompartimentierung der N-Acetylierung am Jejunum von Mensch und Meerschweinchen geschlossen werden (Abb.18a). In Analogie zur bevorzugten Abgabe des Metaboliten Ac-PABA zur Angebotsseite wird dabei im folgenden Text der von der Lumenseite erreichbare Raum als lumenseitiges, der von der Blutseite erreichbare Raum als blutseitiges Metabolisierungskompartiment bezeichnet (Abb.18a).

Ein interessanter Hinweis auf verschiedene Kompartimente in der Mukosa findet sich auch in den Versuchen zum Efflux von Tracer aus mit PABA einseitig vorbeladenen Mukosae (Kap. 5.7.). Hier ist vor allem der Efflux aus den Räumen mit einer größeren Halbwertszeit der Entleerung von Bedeutung, da diese Räume wahrscheinlich mit

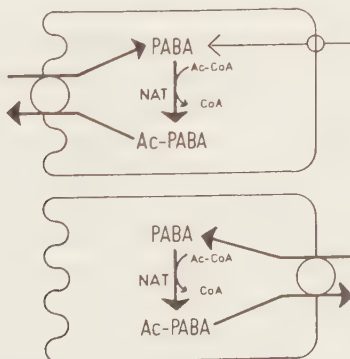


Abb.18a: Kompartimentierung der Metabolisierung von PABA am Meerschweinchen-Jejunum, lumenseitig erreichbarer Raum obere Bildhälfte, nur blutseitig erreichbarer Raum untere Bildhälfte

Kompartimenten des Gewebes identisch sind und damit nicht der Efflux aus anderen Räumen des Versuchssystems (wie z.B. durch die am Kammermaterial anhaftende Angebotslösung) bestimmt wird. Wie bei zwei unterschiedlichen und nur von der Angebotsseite zu erreichenden Kompartimenten zu erwarten, erfolgte der Efflux von Tracer aus diesen tieferen Kompartimenten immer bevorzugt zu der Seite der Vorbeladung und damit wahrscheinlich jeweils zum überwiegenden Anteil aus dem Metabolisierungskompartiment der Vorbeladungsseite. Der Efflux von Tracer aus dem vorbeladenen Gewebe konnte durch 2 mM unmarkiertes PABA im Effluxmedium nicht stimuliert werden. Damit scheidet eine trans-Stimulation von Carrier-Systemen, welche die Aufnahme von PABA und die Abgabe von Ac-PABA in der apikalen und basalen Membran vermitteln, als Basis der beobachteten Verteilung von Ac-PABA ebenfalls aus.

Bei einer Steigerung der Angebotskonzentration von 0,10 auf 2 mM PABA veränderte sich parallel zur Gesamtkonjugationsrate auch die relative Verteilung des Metaboliten. Bezogen auf den insgesamt gebildeten Metaboliten findet sich nun ein verringerter Anteil auf der Angebotsseite; parallel hierzu ist der relative Anteil an Metabolit im Inkubationsmedium der Gegenseite erhöht (Tab.2).

Für die so zu beobachtende Verschiebung der Metabolitenverteilung können zwei Ursachen diskutiert werden: Zum einen wäre es denkbar, daß sich ein Abgabemechanismus des Metaboliten im Bereich einer Sättigung befindet und damit Ac-PABA in einem höheren Anteil zur Gegenseite abgegeben wird. Dieser Mechanismus sollte dabei, je nach Angebotsseite, sowohl für einen lumen- wie auch für einen blutseitigen Carrier im gleichen Konzentrationsbereich wirksam werden und gleichzeitig die Aufnahme von PABA in das Gewebe nicht beeinflussen. In einem anderen Modell könnten Metabolit und Substrat unterschiedliche Flußraten zwischen den beiden metabolisierenden Kompartimenten aufweisen. Das bei 2 mM Substratangebot im Enterocyten in einem höheren relativen Anteil vorliegende PABA könnte dabei den Metabolisierungsraum der Gegenseite erreichen, würde hier zum Teil metabolisiert und dann in die Inkubationslösung der Gegenseite abgegeben. Für diese Hypothese spricht der

hohe Anteil an PABA im Gewebe und in der Gegenlösung wie auch die fehlende Akkumulation des Metaboliten in der Mukosa bei blutseitigem Angebot von 2 mM PABA, die bei einer Sättigung des Ausschleusungsmechanismus zu erwarten wäre.

4.2.5 Untersuchungen zum räumlichen Korrelat des lumenseitigen Metabolisierungsraumes

Eine Kompartimentierung des enteralen Metabolismus von Xenobiotika im Jejunum wirft die Frage nach dem räumlichen Äquivalent der metabolisierenden Räume auf. Eine Kompartimentierung auf intrazellulärer Ebene erscheint aus verschiedenen Gründen unwahrscheinlich, da (1) die Kompartimentierung ein generelles Phänomen des Fremdstoffwechsels darstellt, (2) sich die metabolisierenden Enzyme auf annähernd alle intrazellulären Strukturen verteilen und (3) sich aus dem elektronenmikroskopischen Befund keine intrazelluläre Substruktur als Permeabilitätsbarriere für den Metaboliten anbietet. Auf der anderen Seite sind die Diffusionswege der Metabolite im wässrigen Cytosol so klein, daß eine lokale, höhere Konzentration im Bereich der Membran der Angebotsseite als Erklärung ebenfalls nicht ausreicht.

Als Ursache der Kompartimentierung kann ein Modell diskutiert werden, in dem die Metabolisierung auf verschiedene Zellpopulationen des Epithels aufgeteilt ist. Geht man dabei von einer Kompartimentierung in zwei ihrer Kapazität nach etwa gleich aktiver Räume aus, könnte das lumenseitige Kompartiment mit Zellen aus dem Villus-Spitzenbereich, das blutseitige Kompartiment mit Zellen aus dem Kryptenbereich identisch sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, bietet sich eine selektive Schädigung oder Elimination von Zellen aus dem Villus-Spitzenbereich, wie sie von Weiser (1973) durch EDTA oder Roggin und Mitarbeitern (1972) durch eine hyperosmolare Vorinkubation des Gewebes eingeführt wurde, an. Bei Roggin und Mitarbeitern (1972) führte die lumenseitige hyperosmolare Inkubation des Kaninchen-Jejunums (2,1 Osmol/l) mit Natriumsulfat zu einer spezifischen Schädigung der Villus-Zellen und zu einer Hem-

mung der Glukose-Resorption. Die Zellen der Krypten waren dagegen nicht geschädigt. Nach Madara (1983) führt eine lumenseitige hyperosmolare Inkubation von 600 mOsmol/l im gestriipten Meerschweinchen-Jejunum zu einer sichtbaren Schädigung bei 10-40 % der Enterocyten im oberen Villus-Bereich, jedoch zu keiner sichtbaren Schädigung der Krypten-Zellen. Die geschädigten Zellen sind dabei im elektronenmikroskopischen Befund nicht vollständig aus dem Gewebeverband herausgelöst, sondern zeigen, bei erhaltener Grundstruktur, eine stark verringerte cytoplasmatische Elektronendichte; der elektrische Widerstand des Gewebes wurde durch die hyperosmolare Inkubation gesteigert.

Der lumenseitige Metabolisierungsraum der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums kann, nach Versuchen von Schorn (1986) zur Glukuronidierung des Oestradiols und des 1-Naphthols, selektiv geschädigt werden. Die Schädigung des Gewebes erfolgte über eine lumenseitige Vorinkubation des Gewebes mit einem Puffer, dem Na⁺-Cyclamat in einer Osmolarität von 2 Osmol/l zugegeben war. Gleichzeitig war der von der vaskulären Seite des Gewebes erreichbare Metabolisierungsraum nicht beeinflusst. Eine blutseitige hyperosmolare Inkubation führte dagegen zu einer Schädigung des blutseitigen Metabolisierungskompartimentes, jedoch zu keiner Beeinflussung des lumenseitigen Metabolisierungsraumes.

Eine hypertone Vorinkubation der Lumenseite der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums mit 2 Osmol/l Na⁺-Cyclamat reduziert den zur Lumenseite rücksezernierten Anteil an Ac-PABA auf ein Zehntel der Menge, die bei der mitgeführten Kontrolle in das Lumen abgegeben wurde. Damit ist die Abgabe des Metaboliten zur Angebotsseite fast vollständig unterdrückt. Im Gewebe findet sich ein im relativen Wert erhöhter Anteil an umgesetztem Ac-PABA, der jedoch in diesem Fall nicht auf die extra- und intrazelluläre Anteile des Gewebsgehaltes korrigiert ist. Bezieht man hier den vergrößerten lumenseitigen ER mit ein, so ergibt sich bei lumenseitigem Angebot eine Verminderung in der intrazellulären Konzentration des Tracers (Kap. 5.5). Im Gegensatz zur lumenseitigen Abgabe des Metaboliten nach lumenseitigem Angebot ist die Ver-

teilung des Metaboliten zur Angebotsseite nach blutseitigem Angebot nicht beeinflusst. Damit deutet dieser Versuch, wie die Versuche von Schorn (1986), auf eine Zerstörung des lumenseitigen Metabolisierungsraumes hin. Die Akkumulation des Metaboliten im Gewebe bei blutseitigem Angebot wie die verminderte Abgabe zur Lumenseite weisen darüberhinaus auf die Schädigung eines Carrier-Mechanismus für den Metaboliten in der luminalen Membran hin. Eine ausführliche Diskussion dieses Transportmechanismus findet sich in Kapitel 6.2.5.

Noch deutlicher als bei der Metabolitenabgabe des Substrates PABA konnte, mit der gleichen Noxe, der lumenseitige Metabolisierungsraum für das Substrat AAP geschädigt werden. Hier wird nach lumen-seitigem osmolarem Schock die Verteilung des Metaboliten auf Lumen- und Blutseite unabhängig von der Angebotsseite des Substrates. Anders als beim PABA ist auch bei blutseitigem Angebot die total umgesetzte Menge an AAP wie der zur Blutseite abgegebene Anteil an Ac-AAP herabgesetzt.

Ac-AAP wird, wie bereits erwähnt, aufgrund der im Vergleich zu Ac-PABA geringeren Polarität im weitaus höheren Anteil in die Inkubate der Gegenseiten abgegeben. Damit kann wahrscheinlich der lumenseitige Raum auch bei blutseitigem Angebot an der Acetylierung teilnehmen und Ac-AAP wird dabei auch zur Blutseite freigesetzt. Fällt nun der lumenseitige Raum aus, ist damit auch bei blutseitigem Angebot der in der blutseitigen Inkubationslösung aufzufindende Anteil an Ac-AAP vermindert. Bei lumenseitigem Angebot und Zerstörung des lumenseitigen Metabolisierungsraumes tritt ein vergleichsweise hoher Anteil unkonjugiert über, wird nun vom blutseitigem Raum aufgenommen und metabolisiert zur Blutseite abgegeben. Diese Konjugation von lumenseitig angebotenen Substrat im blutseitigen Metabolisierungskompartiment könnte durch die räumliche Anordnung der Villus- und Krypten-Zellen begünstigt sein. Im Bereich der Spitzen-Zellen resorbiertes AAP muß, bevor es die blutseitige Inkubationslösung erreicht, zuerst den zentralen Bereich der inneren Villus-Struktur passieren. Ergibt sich in diesem Bereich eine lokal erhöhte Konzentrationen des Substrates,

so könnte dies die Aufnahme und Metabolisierung im blutseitigen Kompartiment begünstigen.

Zusammenfassend bestätigen die Versuche mit einer hyperosmolaren Vorinkubation das Modellbild eines lumenseitigen Metabolisierungsraumes, der mit Enterocyten des oberen Villus-Bereiches identisch ist. Nun ist die Oberfläche der lumenseitigen Membran *in vitro* wie *in situ* ähnlich gut erreichbar. Im Gegensatz dazu bestehen bei der *in situ* in ihrem gesamten Bereich gut vaskulär versorgten basolateralen Membran erhebliche Unterschiede zum blutgefäßfreien *in vitro*-Modell. Inwieweit sich damit eine physiologische Signifikanz des blutseitigen Metabolisierungsraumes auch *in situ* nachweisen läßt, muß weiterführenden Untersuchungen überlassen werden.

4.2.6. Stimulation der Konjugation von PABA durch EDTA und Cellobiose

Schorn (1986) konnte den lumen- und blutseitigen Metabolisierungsraum auch durch eine Vorinkubation mit einem Puffer, dem 400 mOsmol/l Cellobiose zugegeben war oder der 5 mM EDTA enthielt, schädigen. Dieser Befund läßt sich nicht auf die Metabolisierung des PABA übertragen. Hier kommt es unter Einfluß des -im Vergleich zum Cyclamat- geringeren osmolaren Schocks oder unter Einfluß von EDTA zu einer deutlichen Steigerung der nach einem lumenseitigem Angebot zur Lumenseite abgegebenen Menge an Ac-PABA.

Über einen direkten Einfluß von EDTA auf die Acetylierungsreaktion ist wenig bekannt. Weber und Cohen (1967) konnten in einer Präparation der N-Acetyltransferase aus der Kaninchen-Leber die Aktivität dieses Enzyms durch Cu^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} und Ni^{++} -Ionen hemmen. Eine Vorinkubation der Transferase mit EDTA konnte den inhibitorischen Effekt weitgehend aufheben, hatte jedoch selbst keinen Einfluß auf die Acetylierung. Eine Wirkung von Cellobiose auf die Acetylierungsreaktion ist in der Literatur nicht beschrieben. Eine direkte Einwirkung der beiden Verbindungen auf die Enzymreaktion reicht als alleinige Erklärung des Befundes nicht aus;

auch in der Kontrollbedingung liegt PABA intrazellulär annähernd vollständig konjugiert vor. Eine zutreffendere Erklärung könnte sich aus einer erhöhten Aufnahme von PABA in den lumenseitigen, metabolisierenden Raum ergeben. Diese Steigerung könnte entweder über eine erhöhte Permeabilität der lumenseitigen Membran oder über einen besseren Zugang zum metabolisierenden Kompartiment, als Teilstruktur der isolierten Mukosa, bewirkt werden.

Im Vergleich der beiden zuletzt diskutierten Mechanismen erscheint es wenig wahrscheinlich, daß zwei so verschiedene Agenzien wie EDTA oder Cellobiose die Permeabilität der lumenseitigen Membran im vergleichbaren Ausmaß erhöhen können. Beiden Inkubationsbedingungen ist gemeinsam, daß Zellen im Bereich der Villus-Spitze geschädigt und/oder aus dem Gewebeverband herausgelöst werden. Wenn das die lumenseitige Metabolisierung vermittelnde Kompartiment nun nicht in den oberen Spitzen-Zellen lokalisiert ist, könnte eine Elimination dieser Enterocyten einen besseren Zugang zum metabolisierenden Raum vermitteln. Damit gelangt mehr PABA in den Metabolisierungsraum und wird von dort, als Ac-PABA, verstärkt zur Angebotsseite, aber auch zur Gegenseite, freigesetzt.

Die unter Einfluß von EDTA und Cellobiose aufgetretenen neuen Metaboliten verhalten sich ähnlich zu der Verteilung des Ac-PABA mit einer bevorzugten Abgabe zu der Seite des Substratangebotes. Obwohl zur chemischen Struktur dieser Verbindungen nur sehr hypothetische Aussagen getroffen werden können (aufgrund des Ausgangssubstrates und des Verteilungstyps erscheint eine sehr polare Struktur als wahrscheinlich), kann für diese Verbindungen einmal mehr das generelle Phänomen der Kompartimentierung des Metabolismus im Jejunum belegt werden.

4.3. Verteilung der Metaboliten von PABA und AAP am Colon

4.3.1 Verteilung zur lumen- und blutseitigen Inkubationslösung

Das Verteilungsmuster des Metaboliten Ac-PABA ist am Colon bei Mensch und Meerschweinchen verschieden. Im humanen Präparat ähnelt die Verteilung grundlegend der am Jejunum, wobei sich wiederum der größte Anteil des Metaboliten im Medium der Angebotsseite findet. Beim Meerschweinchen verteilt sich Ac-PABA immer mit einer, wenn auch nur zum Teil geringfügigen, Bevorzugung der Blutseite. Eine Abhängigkeit der Metabolitenfreisetzung von der Angebotsseite bleibt jedoch erhalten; das Verteilungsmuster ist zwischen lumen- und blutseitigem Angebot nicht identisch. So findet sich im lumen-seitigen Inkubat, bei einer sonst vergleichbaren Gesamtmetabolisierungsrates, nach einem lumenseitigen Angebot 7-10 mal mehr Ac-PABA als nach einem blutseitigen Angebot. Die relative Verteilung des Metaboliten wird über eine Steigerung der Angebotskonzentration nicht beeinflusst.

Kann schon für das vergleichsweise polare Ac-PABA keine so eindeutige Abhängigkeit in der Metabolitenverteilung von der Angebotsseite wie am Jejunum beobachtet werden, verteilt sich Ac-AAP am Meerschweinchen-Colon mit einer nur geringfügigen Bevorzugung der Angebotsseiten. Die vergleichsweise hohen Transferraten der unkonjugierten Verbindung weisen auf eine Sättigung der Acetylierungsreaktion hin.

4.3.2. Mechanismus der von der Angebotsseite abhängigen Verteilung von Ac-PABA

Eine Diskussion der Verteilung des Metaboliten, aber auch der Unterschiede zwischen dem Human- und Meerschweinchen-Colon, ist ohne ein Einbeziehen der in Kap.8 ausführlich diskutierten Permeationsmechanismen nicht möglich. Die pH-Bestimmung des Perfusates in den in situ-Experimenten beim Meerschweinchen ergibt eine starke Ansäuerung des lumenseitigen Mediums. Dieser Ansäuerungs-

mechanismus ist nach den Permeationsversuchen die treibende Kraft der Netto-Resorption von PABA; für eine vom pH-Wert unabhängige Resorption finden sich dagegen keine Hinweise. Im Gegensatz zur Lumenseite kann die Säure die blutseitige Membran carriervermittelt passieren und wird über diesen Mechanismus auch nach lumenalem Angebot aus dem Gewebe eliminiert.

Die beobachtete Verteilung des Ac-PABA im Metabolisierungsversuch steht in guter Übereinstimmung mit diesem Modellbild. So ist die fast ausschließliche Abgabe des Ac-PABA zur Blutseite bei blutseitigem Angebot gut mit einer für PABA und Ac-PABA permeablen contraluminalen und einer für die Ionen impermeablen luminalen Membran zu erklären (Abb.18b). Ebenso steht die überwiegende Abgabe des Ac-PABA zur Blutseite nach lumenalem Angebot in Übereinstimmung mit diesem Modell. Nicht erklärt werden kann jedoch der vergleichsweise hohe Anteil an acetylierter Verbindung in der lumen-seitigen Inkubationslösung, der nur bei lumenseitigem Angebot zu beobachten war. Es scheint, als ob PABA bei lumenalem Angebot zwei Räume erreichen kann: den Raum der transepithelialen Permeation (A) mit Verbindung zur Blutseite oder einen lumenseitigen Metabolisierungsraum (B) ohne Verbindung zur Blutseite (Abb.18b).

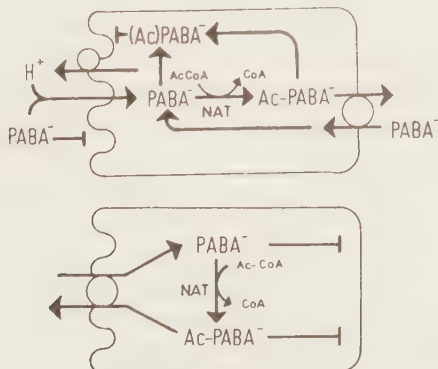


Abb.18b: Kompartimentierung der Metabolisierung von PABA am Meerschweinchen-Colon, beidseitig erreichbarer Raum obere Bildhälfte, nur lumenseitig erreichbarer Raum untere Bildhälfte

Wie bereits erwähnt, ist die luminale Membran von Raum A für ionisiertes PABA oder Ac-PABA impermeabel. Dies muß jedoch nicht für Raum B gelten, der selber ja nicht an der transepithelialen Permeation der Säure beteiligt ist. Damit könnte dieser Raum auch für die sättigungsfähige Komponente der Aufnahmekinetik nach kurzzeitigem lumenalem Angebot (Kap.7.2.3.) verantwortlich sein. Für einen vermittelten Transport in dieses Kompartiment spricht auch, daß trotz der unterschiedlichen Resorptionsquote bei Meerschweinchen und Mensch der zur Lumenseite bei lumenseitigem Angebot zurückseziernierte Anteil an Ac-PABA bei beiden Spezies identisch ist.

Ein weiterer Hinweis auf eine Kompartimentierung in zwei unterschiedlich erreichbare Räume findet sich auch im Effluxexperiment einseitig mit PABA vorbeladener Mukosae (Kap.7.3.4.). Ähnlich dem Jejunum ist dabei ebenfalls der Efflux aus den tieferen Kompartimenten höherer Halbwertszeit von Bedeutung. Obwohl der Efflux, ebenso wie die Metabolitenabgabe, immer bevorzugt zur Blutseite erfolgte, tritt dabei in die lumenseitige Effluxlösung mehr Tracer nach einer lumenseitigen Vorbeladung als nach einer blutseitigen Vorbeladung aus.

Zieht man das Modellbild des Permeationsmechanismus von PABA mit heran, wird auch die Ursache der Unterschiede in der Verteilung von Ac-PABA zwischen Mensch und Meerschweinchen deutlich. Die eigentliche Differenz zwischen beiden Präparaten findet sich dabei in dem bei lumenseitigem Angebot zur Gegenseite transferierten Anteil an Tracer oder, anders ausgedrückt, in der Resorptionsrate. Da beim Meerschweinchen die Resorptionsrate direkt proportional zum Anteil der freien Säure und damit zur Ansäuerung ist, erscheint eine vergleichbare Ansäuerung der Lumenseite beim humanen Präparat unwahrscheinlich. Tatsächlich findet sich in der Literatur kein Hinweis auf eine Ansäuerung des Colon-Lumens beim Menschen. So konnten Bown und Mitarbeiter (1974) über eine radiotelemetrische Sonde einen pH-Wert in der Nähe des Neutralpunktes bestimmen. Bakteriell fermentierbare Lactulose führte zu einem Abfall des pH-Wertes im oberen Colon, der jedoch bei weiterer

Passage in Richtung des Neutralpunktes ausgeglichen wurde. McNeil und Mitarbeiter (1978) berichten von einer Änderung des pH-Wertes von 7,2 auf 7,9-8,0 in mit Puffer gefüllten Dialyse-Säckchen, wobei jedoch die angebotene Versuchslösung eine vergleichsweise hohe Konzentration kurzkettiger Fettsäuren enthielt.

In der Literatur liegen nur wenige Studien zur Verteilung N-acetylierter Substrate am Colon vor. Yasuhara und Mitarbeiter (1978) beschreiben am everted sac des Ratten-Colons keine Anreicherung von Ac-PABA in der luminalen Inkubationslösung nach lumenseitigem Angebot von PABA. Bezeichnend für dieses Präparat sind jedoch sehr unterschiedliche Volumina der mukosalen und serosalen Inkubationslösungen. Bezieht man diese Volumina mit in die Analyse ein, so findet sich die vierfache Menge an acetyliertem Substrat auf der Angebotseite. Bondensen und Mitarbeiter (1986) untersuchten in einer klinischen Studie die steady state Kinetik von 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) nach oraler Gabe von Sulfasalazin. Diese Verbindung wird im Colon bakteriell gespalten und 5-ASA wird in diesem Darmabschnitt acetyliert. Die Konzentration des gebildeten Ac-5-ASA übersteigt in den Faeces die des Serums um den Faktor $1-2 \cdot 10^3$.

4.3.3 Verteilung anderer Konjugate

Die Acetylierung des PABA stellt den ersten metabolischen Prozeß des Meerschweinchen- und Human-Colons dar, für den eine Kompartimentierung in einen nur lumenseitig und einen von beiden Seiten erreichbaren Raum belegt werden kann. Im Gegensatz hierzu erfolgt die Abgabe der Glukuronide des 1-Naphthols (Sund und Lauterbach, 1985), des Oestradiols (Schorn, 1986) und des p-Nitrophenols (Fries, 1986) unabhängig von der Angebotsseite fast ausschließlich in den blutseitigen Raum. Vergleichbar dazu werden die über die Sulfo-Konjugation gebildeten Metabolite des 1-Naphthols (Sund und Lauterbach, 1985) und des p-Nitrophenols (Fries, 1986) am Colon wahrscheinlich ebenfalls unabhängig von der Angebotseite aus dem Enterocyten abgegeben.

Wie bereits diskutiert, könnte der Transport von PABA in und Ac-PABA aus dem nur lumenseitig erreichbaren Metabolisierungsraum über einen Carrier vermittelt werden. Die bei den Glukuroniden zu beobachtende Verteilung belegt, das entweder diese Verbindungen nicht oder nur im geringen Umfang über diesen Carrier transportiert werden können oder das in dem von PABA lumenseitig erreichbaren Kompartiment keine Konjugation mit Glukuronsäure stattfindet.

4.3.4. in situ Korrelation der in vitro Ergebnisse

Eine in situ-Perfusion des Darmlumens bestätigt und ergänzt die in vitro erhobenen Befunde. Die in vitro aufgefundene Ansäuerung der lumenseitigen Inkubationslösung (Kap.7.2.3.) konnte auch in situ bestätigt werden. Der damit erhöhte Anteil an freier Säure im Perfusat führte zu einer erheblichen Resorption von PABA aus dem Perfusat unabhängig von der Flüssigkeitsresorption. Bei der Ratte kam es dagegen zu keiner Ansäuerung der Perfusionslösung und zu ebenfalls keiner Änderung in der Konzentration des Tracers im Perfusat. Grundsätzlich entspricht damit das Ratten-Colon eher als das Meerschweinchen-Colon dem humanen Präparat, bei dem die Resorptionsrate ebenfalls geringer war und der Mechanismus der Ansäuerung wahrscheinlich fehlt.

Sowohl beim Meerschweinchen wie bei der Ratte wird im Perfusionsverlauf acetyliertes Substrat zur Lumenseite abgegeben. Beim Meerschweinchen übersteigt der aus dem Lumen resorbierte den in das Lumen zurücksezernierten Anteil an Ac-PABA bei weitem. Vergleicht man beim Meerschweinchen die im Lumen aufgefundenen Anteile am Versuchsende zwischen dem in situ und in vitro-Ansatz, ergibt sich -zieht man die unterschiedliche Methodik in Betracht- eine gute Übereinstimmung beider Ergebnisse. Im Gegensatz zu der Übereinstimmung zwischen dem in vitro-Präparat bei Meerschweinchen und Mensch fällt bei der Ratte der zur Lumenseite abgegebene Anteil an Ac-PABA deutlich geringer als beim Meerschweinchen aus.

4.3.4 Hemmung des Transportes von Ac-PABA in der contraluminalen Membran

Lauterbach (1983) konnte die Netto-Sekretion von β -Naphtholorange durch blutseitig gegebenes Phenoxybenzamin (PBA) hemmen. Daher lag es nahe, dieses relativ unspezifische alkylierende Agens auch bei den Untersuchungen zum Transport von PABA einzusetzen. PBA könnte dabei einerseits einen Transportmechanismus der Säure, andererseits aber auch die luminale Ansäuerung beeinflussen.

Lumenseitig gegebenes PBA beeinflusst weder die Resorptionsquote noch den bei lumenseitigem Angebot rücksezernierten Anteil an Ac-PABA. Damit erweist sich der in der luminalen Membran vorgeschlagene Transportmechanismus des nur lumenseitig erreichbaren Metabolisierungsraumes als nicht durch PBA hemmbar. Im Gegensatz zu lumenseitig gegebenem PBA erzeugt der blutseitig gegebene Inhibitor eine Vielzahl von Effekten, die zum Teil in einem gewissen Widerspruch zu dem in Kapitel 8 formulierten Permeationsmodell stehen.

Bei lumenseitigem Substratangebot und blutseitiger Inhibitorgabe führt PBA bei einer gleichgebliebenen Gesamtacetylierungsrate zu einer Umverteilung des Metaboliten zur Angebotsseite, also zu einer Hemmung der blutseitigen Abgabe von Ac-PABA bei gleichbleibender lumenseitiger Aufnahme von PABA. Parallel ergaben jedoch die Versuche zum Permeationsmechanismus eine verminderte Ansäuerung der Lumenseite (Kap. 7.2.6), die zu einer reduzierten Aufnahme von Substrat über die lumenseitige Membran und damit zu einer Verminderung der Gesamtacetylierungsrate führen sollte. In einem vergleichbaren Widerspruch stehen die Ergebnisse bei einer blutseitigen Substrat- und Inhibitorgabe, wo es zu keiner Inhibition der Aufnahme von PABA kommt. PBA vermag damit nur den Abgabeschritt des Metaboliten, nicht jedoch die Aufnahme des Substrates zu inhibieren. Welchem Mechanismus die Bildung und Verteilung von Ac-PABA unter Einfluß des PBA folgt, muß weiterführenden Studien überlassen werden.

5. Ergebnisteil der Untersuchungen zum Permeationsmechanismus von PABA am Jejunum

5.1. Aerobe Inkubation bei 37°C

5.1.1. Feuchtgewicht, ER und shunt-Permeabilität

Die anteilmäßig größte Gruppe der Versuchskammern, deren passive Parameter wie Feuchtgewicht, ER und shunt-Permeabilität hier analysiert werden, stellen die mit einem Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer, pH 7,00, unter Sauerstoffbegasung bei 37°C durchgeführten Versuche dar. Das mittlere Gewicht der eingesetzten Tiere betrug 457,1 +/- 6,8 g, N=124 (berechnet auf Basis der Versuchskammern). Es wurden bis zu 10 Darmstücke entnommen. Dabei entfielen 70% der Versuchskammern auf Präparate der ersten fünf und 30% auf die folgenden fünf Darmabschnitte. Das Feuchtgewicht der Mukosae beträgt

Tab.19a: Feuchtgewicht, ER und Marker-Flüsse der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums nach Angaben verschiedener Autoren
Inkubationsmedium: Krebs-Tris-Glukose-Mannit, 37°C, Sauerstoff

Autor Marker*	(1) C ¹⁴ Inulin	(2) H ³ Inulin	(3) C ¹⁴ Inulin	(4) C ¹⁴ Inulin
FG mg	12,01	11,87	11,2	11,98
S.E.M.	0,01	0,38	0,19	0,38
N	276	22	131	26
Angebotsseite Lumen:				
ER %		19,23		13,99
S.E.M.		2,24		1,24
N		9		13
Marker %	0,34	0,286	0,458	0,038
S.E.M.	0,02	0,038	0,021	0,005
N	131	36	27	10
Angebotsseite Blut :				
ER %		16,33		8,54
S.E.M.		1,88		0,30
N		13		13
Marker %	0,52	0,383	0,501	0,185
S.E.M.	0,02	0,025	0,024	0,021
N	143	40	21	11

(1) Turnheim und Lauterbach 1977a, (2) Lauterbach 1977, (3) Sund und Lauterbach 1978, (4) Kersten 1982, * Inulin wurde in verschiedenen mittleren Molekulargewichten eingesetzt

11,41 +/- 0,15 mg, N=124. Zwischen Tiergewicht und Feuchtgewicht oder Darmstück und Feuchtgewicht besteht keine Abhängigkeit.

Der mittlere extrazelluläre Raum der Mukosae beträgt nach lumen-seitigem Angebot 1,823 +/- 0,069 µl, N=53 und nach blutseitigem Angebot 1,637 +/- 0,053 µl, N=57. Für beide Räume ergibt sich eine positive Korrelation gegenüber dem Feuchtgewicht. Berechnet man den extrazellulären Raum in Prozent, so ergibt sich ein mittlerer ER% der Lumenseite von 15,64 +/- 0,54%, N=53 und der Blutseite von 13,91 +/- 0,37 %, N=57, des Feuchtgewichtes. Wie Kilian (un-veröffentlichte Mitteilung) in Untersuchungen am Präparat der iso-lierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums belegen konnte, sind beide Räume voneinander unabhängig; die in die Inkubationslösung der Gegenseite übergetretene Menge an Marker kann mit einem Anteil <1% vernachlässigt werden. Der gesamte extrazelluläre Raum des Gewebes ergibt sich somit aus der Summe beider Räume mit einem Anteil von 29,55 % des Feuchtgewichtes.

Tab.19b: Feuchtgewicht, ER und Marker-Flüsse der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums nach Angaben verschiedener Autoren
Inkubationsmedium: Krebs-Tris-Glukose-Mannit, 37°C, Sauerstoff

Autor Marker*	(5) H ³ PEG	(6) H ³ PEG	(7) H ³ PEG	(8) H ³ PEG
FG mg	12,76	14,02	12,41	11,41
S.E.M	0,21	0,43	0,29	0,15
N	125	60	71	124
Angebotsseite Lumen:				
ER %	13,32	17,76	13,29*	15,64
S.E.M.	0,50	0,71		0,54
N	63	28		53
Marker %	0,287	0,279		0,367
S.E.M.	0,016	0,025		0,019
N	60	39		53
Angebotsseite Blut :				
ER %	12,69	15,22	13,29*	13,91
S.E.M.	0,33	0,65		0,37
N	62	32		57
Marker %	0,484	0,498		0,495
S.E.M.	0,068	0,057		0,025
N	62	39		57

(5) Sprakties 1983, (6) Fischer und Lauterbach 1983, (7) Fries 1986, (8) vorliegende Arbeit, * errechnet aus dem Mittel der Extrazellulärräume in µl und dem Feuchtgewicht

Die in dieser Studie über den Durchtritt von PEG900 bestimmte shunt-Permeabilität ist nach blutseitigem Angebot des Markers mit $0,495 \pm 0,025\%$, $N=57$, hochsignifikant höher als nach lumenseitigem Angebot mit $0,367 \pm 0,019\%$, $N=53$. Diese von der Angebotsseite abhängende Differenz der extrazellulären Permeabilität konnte schon von anderen Autoren (vgl.Tab.19a,b) am Präparat der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums für Inulin und PEG900 beobachtet werden.

Eine Analyse der Tiergewichte und der verwendeten Darmstücke ergibt einen schwachen, erst bei einer großen Anzahl von Einzelwerten erkennbaren Einfluß dieser Parameter auf die shunt-Permeabilität. Dabei erweisen sich im Mittel die Mukosae der schwereren Tiere unabhängig von der Angebotsseite als dichter im Sinne einer geringeren shunt-Permeabilität. Berechnet man auf der Grundlage der Regressionsanalyse die Permeabilität in Abhängigkeit vom Tiergewicht, so ergibt sich nach lumenalem resp. blutseitigem Angebot in der Gewichtsklasse der Tiere mit dem geringsten Gewicht (Tiergewicht 360 g) $0,423\%$ und $0,590\%$, in der höchsten Gewichtsklasse (Tiergewicht 550 g) von $0,309\%$ und $0,381\%$. Bei den distaleren Darmabschnitten, die gegenüber den proximaleren Präparaten später entnommen wurden, ist eine Steigerung der shunt-Permeabilität zu beobachten. Die aus der Regressionsanalyse abzuleitenden PEG-Permeabilitäten betragen nach lumenalem resp. blutseitigem Angebot für das erste Darmstück $0,313\%$ und $0,431\%$, die für das zehnte Darmstück $0,451\%$ und $0,601\%$.

5.1.2. Konzentrationsabhängigkeit der Permeation von PABA

PABA wurde in diesen Versuchen in einer Konzentration von $0,01-50$ mM lumen- oder blutseitig in einem Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer angeboten. Die Substratkonzentration hatte keinen Einfluß auf das Feuchtgewicht, die Extrazellulärräume oder auf die shunt-Permeabilitäten des Gewebes.

Die Permeationsraten der p-Aminobenzoesäure sind in allen untersuchten Konzentrationen in sekretorischer Richtung signifikant höher als in resorptiver Richtung (Abb.19,Tab.20). Im Konzentrationsverlauf läßt sich dabei eine statistisch belegbare Steigerung, sowohl des sekretorischen wie resorptiven Flusses, bei einer Erhöhung der Konzentration von 10 auf 100 μM belegen. Im Konzentrationsbereich über 20 mM ist eine beginnende Sättigung des sekretorischen Flusses zu beobachten.

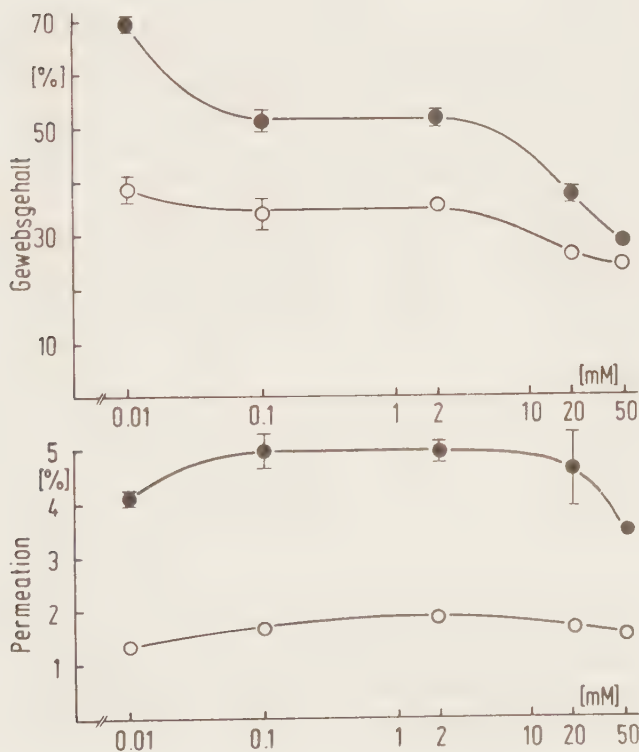


Abb. 19: Konzentrationsabhängigkeit von Gewebsgehalt (oben) und Permeation (unten) nach blut-(●) und lumenseitigem (○) Angebot von 0,01 - 50 mM PABA am Meerschweinchen-Jejunum, Krebs-Tris-Glukose-Mannit, pH 7,00, Anzahl Versuche pro aufgetragenen Wert s.Tab.20

Der nach Versuchsende im Gewebe der Mukosa zu bestimmende Gehalt an PABA ist in allen Konzentrationen nach blutseitigem Angebot signifikant höher als nach lumenseitigem Angebot. Die Steigerung der Angebotskonzentration führt sowohl bei lumen- wie blutseitigem Angebot zu einer Verringerung des Gewebsgehaltes. Die dabei relativ stärkere Beeinflussung der Gehalte nach blutseitigem Angebot führt bei einer Substratkonzentration von 50 mM zu einer Angleichung der Gewebsgehalte bei lumen- und blutseitigem Angebot auf ein gleiches Niveau.

Tab.20 : Gewebsgehalt und Permeationsraten nach 45 minütiger Inkubation lumen- oder blutseitig gegebenen PABA am Meerschweinchen-Jejunum Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer, pH=7,00, O₂, 37°C; Stat. Vergleich (*-***). Angebotsseite Lumen gegen Blut, (o-ooo) gegen nächst niedere Angebotskonzentration gleicher Angebotsseite

Konzentration (mM)	0,01	0,10	2,00	20,00	50,00
Angebotsseite Lumen:					
Gewebsgehalt (%)	38,59***	33,94**	35,74***	26,16***	24,63*
S.E.M.	2,39	2,95 ^{ns}	1,08 ^{ns}	0,74 ^{ooo}	0,32 ^o
N	31	4	4	4	8
Permeation (%)	1,33***	1,67***	1,84***	1,66**	1,55***
S.E.M.	0,07	0,09 ^o	0,09 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,11 ^{ns}
N	35	8	7	4	8
Angebotsseite Blut:					
Gewebsgehalt (%)	69,81	51,38 ^{ooo}	51,87 ^{ns}	37,61 ^{ooo}	28,80 ^{ooo}
S.E.M.	1,51	2,19	1,51	1,40	1,22
N	34	4	4	4	8
Permeation (%)	4,12	4,98 ^o	4,97 ^{ns}	4,61 ^{ns}	3,47 ^{ns}
S.E.M.	0,17	0,32	0,12	0,73	0,12
N	37	8	9	4	8

Nach einer Steigerung der Angebotskonzentration von 10 auf 100 µM kommt es parallel zur Verringerung des im Gewebe aufzufindenden Anteils zu einer Erhöhung der Permeationsrate. Ausgedrückt in Prozent des Angebotes beträgt diese Minderung des Gewebsgehaltes bei lumenseitigem Angebot 0,137 % und bei blutseitigem Angebot 0,753 %. Addiert man diese Beträge zur Permeation bei 10 µM, so ergibt sich eine Permeationsrate von 1,467 % und 4,873 %. Damit ist der über die Membran der Angebotsseite permeierte Anteil an PABA bei 10 und 100 µM in etwa gleich. Die geringere Permeation

bei 10 μM ist dagegen durch den höheren Gewebsgehalt und die verminderte Abgabe zur Gegenseite bedingt.

Die pH-Werte der Inkubationslösungen zeigen nach Versuchsende eine seitenspezifische Änderung. Ausgehend von einem pH-Wert von 7,009 verändert sich der lumenseitige pH-Wert in alkalischer Richtung auf $7,072 \pm 0,010$, $N=10$, während sich der blutseitige pH-Wert mit $6,966 \pm 0,008$, $N=10$, in die saure Richtung verschiebt. Die Inkubation mit 10 μM PABA hat keinen Einfluß auf diese pH-Wert Änderungen.

5.2. Anaerobe Inkubation bei 37°C

Als Inkubationsmedium wurde in dieser Versuchsbedingung ein Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer, pH 7,00, gewählt. Wie schon von anderen Autoren beschrieben (Tab.21) ist unter dem Einfluß der Anaerobiose ein Anstieg des mittleren Feuchtgewichtes zu beobachten. Verglichen mit den unter aerober Inkubation gewonnenen Werten (5.1.1) ergibt sich dabei ein hochsignifikanter Anstieg des Feuchtgewichtes um 28,7 % auf $14,68 \pm 0,48$ mg, $N=28$. Der lumenseitige ER in μl ist gegenüber der Vergleichsgruppe um 11,5 %, wenn auch statistisch nicht signifikant, erhöht. Der absolute Wert des lumenseitigen ER beträgt $2,033 \pm 0,126$ μl , $N=14$. Dagegen ist der blutseitige ER mit $1,644 \pm 0,075$ μl , $N=14$, nicht verändert. Aufgrund der prozentual größeren Erhöhung des Feuchtgewichtes gegenüber der Erhöhung des ER kommt es in beiden Angebotsseiten zu einer Verringerung des prozentualen ER, welcher mit $14,28 \pm 0,93$ %, $N=14$ (nicht signifikant gegen Vergleichsgruppe) nach lumenseitigem Angebot und $11,27 \pm 0,69$ %, $N=14$ (signifikant gegen Vergleichsgruppe) nach blutseitigem Angebot bestimmt werden konnte. Der Gesamt-ER des Präparates beträgt im Mittel 25,55%. Die Erhöhung des absoluten extrazellulären Raumes reicht als Erklärung der erhöhten Feuchtgewichte nicht aus, so daß man unter Einfluß der Anaerobiose auf eine erhöhte Wasseraufnahme der Zellen schließen kann.

Tab. 21 : Feuchtgewicht, ER und Marker-Flüsse der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums nach Angaben verschiedener Autoren
 Inkubationsmedium: Krebs-Tris-Glukose-Mannit, 37°C, Stickstoff

Autor Marker*		(1) C ¹⁴ Inulin	(2) C ¹⁴ Inulin	(3) H ³ PEG	(4) H ³ PEG
FG mg		13,68	12,0	13,78	14,68
	S.E.M.	0,01	0,28	0,33	0,48
	N	228	36	24	28
Angebotsseite Lumen:					
ER %				14,74	14,28
	S.E.M.			0,52	0,93
	N			11	14
Marker %		0,54	0,800	0,416	0,461
	S.E.M.	0,03	0,052	0,076	0,061
	N	113	15	8	13
Angebotsseite Blut :					
ER %				14,93	11,27
	S.E.M.			0,51	0,69
	N			13	14
Marker %		0,65	0,933	0,580	0,687
	S.E.M.	0,02	0,066	0,027	0,040
	N	111	16	12	14

(1) Turnheim und Lauterbach 1977a, (2) Sund und Lauterbach 1978, (3) Sprak-ties 1983, (4) vorliegende Arbeit, * Inulin wurde in verschiedenen Moleku-largewichten eingesetzt

Obwohl die Asymmetrie der shunt-Permeabilität mit Bevorzugung der sekretorischen Richtung unter Anaerobiose erhalten bleibt, kommt es sowohl in resorptiver Richtung mit 0,461 +/- 0,061 %, N=13, (statistisch nicht signifikant gegen Vergleichsgruppe) wie auch in sekretorischer Richtung mit 0,687 +/- 0,040 %, N=14 (statistisch hochsignifikant gegen Vergleichsgruppe), zu einer Erhöhung der Flüsse gegenüber der aeroben Vergleichsbedingung.

Kann unter Sauerstoffbegasung eine Netto-Sekretion von PABA beobachtet werden, so ändert sich die Vorzugsrichtung der Permeation unter Anaerobiose zu einer Netto-Resorption (Abb.20,Tab.22). Bei lumenseitigem Angebot erhöht sich die Permeationsrate, relativ zu den im Tris Medium unter Sauerstoff inkubierten Kammern, um 89,7 %. Parallel zu dieser Erhöhung steigt auch die am Versuchs-

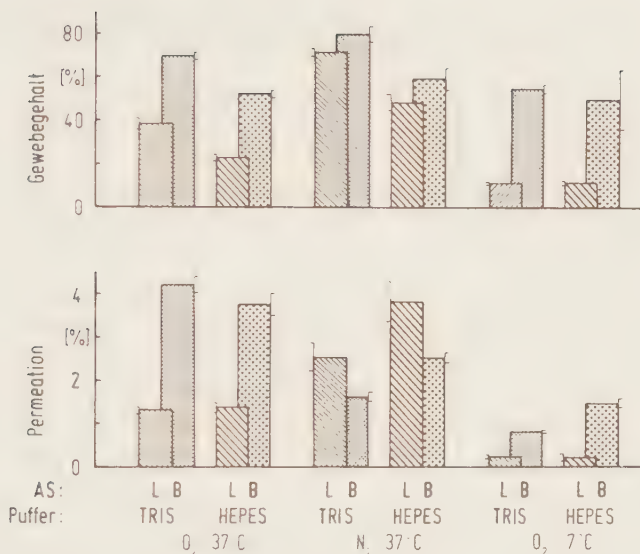


Abb. 20: Gewebsgehalt (oben) und Permeation (unten) von 10 µM PABA nach blut- (B) und lumenseitigem (L) Angebot im Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer (Tris), pH=7,00 und Krebs-Hepes-Glukose-Mannit Puffer (Hepes), pH=7,27; Anzahl Versuche pro Säule s.Tab.20,22-25

ende in der Mukosa aufgefundene Konzentration an PABA um 85,5 %. Die erhöhte Permeationsrate könnte somit in einer erhöhten Permeabilität der lumenseitigen Membran für PABA begründet sein.

Nach blutseitigem Substratangebot ist die Permeationsrate um 60,5 %, gegenüber den unter Sauerstoffbegasung bestimmten Werten, erniedrigt (Abb.15, Tab.22). Der Gewebsgehalt ist jedoch nicht in der gleichen Richtung reduziert, sondern um 14,4 % erhöht. Damit ist die bei blutseitigem Angebot gegenüber den aeroben Werten verminderte Permeation weniger in der verminderten Aufnahme in das Gewebe als in der erniedrigten Abgabe aus dem Enterocyten über die lumenseitige Membran begründet.

Tab.22 : Einfluß der Anaerobiose auf Gewebsgehalt und Permeation bei einem lumen- oder blutseitigen Angebot von 10 μ M PABA am Meerschweinchen-Jejunum; Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer, pH=7,00, 37°C

Angebotsseite	Lumen	Blut
Gewebsgehalt (%)	71,60	79,84*
S.E.M.	1,77	3,52
N	14	14
Permeation (%)	2,53	1,63**
S.E.M.	0,32	0,12
N	13	14

Eine Alkalisierung des lumenseitigen Mediums, wie sie unter der Sauerstoffbegasung zu beobachten ist, kann unter dem Einfluß der Anaerobiose nicht beobachtet werden. Stattdessen tritt eine pH-Wert Verschiebung in den sauren Bereich sowohl im lumen- wie im blutseitigen Puffer auf. Der pH-Wert des Mediums verändert sich dabei von 7,009 auf 6,965 $\pm$ 0,010, N=6, im lumenseitigen und auf 6,957 $\pm$ 0,010, N=6, im blutseitigen Raum.

5.3. Aerobe Inkubation bei 7°C

PABA wurde in einem Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer in einer Konzentration von 0,01, 0,1 und 2 mM eingesetzt. Das mittlere Feuchtgewicht dieser Versuchsbedingung ist mit 12,53 $\pm$ 0,21 mg, N=24, gegenüber der bei 37°C inkubierten Vergleichsbedingung, hochsignifikant erhöht. Ebenfalls signifikant erhöht ist der blutseitige extrazelluläre Raum mit 2,043 $\pm$ 0,112 μ l, N=12, und der blutseitige extrazelluläre Anteil der Mukosae mit 15,99 $\pm$ 0,56%, N=12. Eine Erhöhung des lumenseitigem ER mit 1,980 $\pm$ 0,105 μ l, N=12, ist dagegen statistisch nicht zu belegen. Der lumenseitige ER ist mit 16,15 $\pm$ 0,96 %, N=12, des Feuchtgewichtes ähnlich dem der Vergleichsgruppe.

Die deutlichste relative Veränderung in den passiven Parametern zur Vergleichsgruppe kann für die Werte der shunt-Permeabilität ermittelt werden. Sowohl die Permeationsraten des PEG900 nach lumenseitigem Angebot mit 0,105 $\pm$ 0,009 %, N=12, wie die nach

blutseitigem Angebot mit 0,087 +/- 0,009 %, N=12, sind hochsignifikant geringer als die der bei 37°C inkubierten Kammern.

Eine Inkubation der Versuchskammern bei 7°C führte trotz Einschränkung aller Flußraten zu keiner Unterdrückung der Nettosekretion von PABA (Abb.20). Das Verhältnis der Flüsse (resorptive Permeationsrate durch sekretorische Permeationsrate) als Ausdruck einer Permeationsasymmetrie zeigt für 7°C in allen untersuchten Konzentrationen mit 0,296 bei 10 µM, 0,222 bei 100 µM und 0,296 bei 2mM eine deutlichere Netto-Sekretion als die Vergleichswerte bei 37°C mit 0,323 bei 10 µM, 0,335 bei 100 µM und 0,370 bei 2mM Substratangebot. Die Gewebsgehalte waren nach blutseitigem Angebot in allen Konzentrationen signifikant höher als nach lumenseitigem Angebot (Abb.20,Tab.23).

Tab.23 : Einfluß der Kälte auf Gewebsgehalt und Permeationsraten lumen- oder blutseitig gegebenem PABA am Meerschweinchen-Jejunum; Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer, pH=7,00, O₂, 7°C; Stat. Vergleich (*-***), Angebotsseite Lumen gegen Blut, (0-000) gegen nächst niedere Angebotskonzentration gleicher Angebotsseite

Konzentration (mM)		0,01		0,10		2,00	
Angebotsseite		Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
PABA							
Gewebsgehalt (%)		11,20	55,05***	9,09	36,40***	8,97	31,08***
S.E.M.		0,53	2,08	0,56°	2,72°°	0,55 ^{ns}	1,72 ^{ns}
Permeation (%)		0,241	0,815***	0,205	0,922***	0,184	0,621***
S.E.M.		0,050	0,039	0,029 ^{ns}	0,034 ^{ns}	0,027 ^{ns}	0,029°°°
Q ₁₀		1,77	1,72	2,01	1,75	2,15	2,00
Marker							
Permeation (%)		0,127	0,124 ^{ns}	0,095	0,067 ^{ns}	0,095	0,070 ^{ns}
S.E.M.		0,018	0,014	0,016 ^{ns}	0,006°°	0,012 ^{ns}	0,005°
Q ₁₀		1,38	1,63	1,62	1,98	1,60	1,93
N		4	4	4	4	4	4

Ein mögliches Vergleichsmaß für die bei 7°C und 37°C gewonnenen Wertepaare ist der Q₁₀-Wert. Dabei wird der Q₁₀-Wert aus dem Verhältnis der Permeationsraten bei 7°C und 37°C mit der nachfolgenden Funktion errechnet:

$$\log Q_{10} = \frac{10}{37 - 7} * \log \frac{\text{Perm. } 37^{\circ}\text{C}}{\text{Perm. } 7^{\circ}\text{C}}$$

Für die Einschränkung der PEG-Permeation in der Kälte lassen sich in allen Fällen höhere Werte nach blutseitigem als nach lumenseitigem Angebot errechnen (Tab.23). Die Änderung der Permeationsraten des PABA ist generell mit der des Markers vergleichbar, dabei jedoch bei lumenseitigem Angebot ausgeprägter als nach blutseitigem Substratangebot (Tab.23).

5.4. Einfluß des pH-Wertes des Inkubationsmediums

Zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf den Permeationsmechanismus von PABA wurde ein Krebs-Hepes-Glukose-Mannit Medium mit einem pH-Wert von 6,48, 7,27 und 7,82 eingesetzt. Dabei wurden am Jejunum des Meerschweinchens Versuche bei 37°C und Sauerstoffbegasung, 7°C und Sauerstoffbegasung und 37°C und Stickstoffbegasung durchgeführt.

5.4.1. Feuchtgewicht, ER und shunt-Permeabilität

Ein statistischer Vergleich zwischen der mit Tris-Puffer bei einem pH-Wert von 7,00 inkubierten Vergleichsgruppe und den bei einem pH-Wert von 7,27 mit Hepes-Puffer inkubierten Versuchskammern (Tab.24) ergibt, bis auf eine geringfügige Erhöhung des PEG-Flusses nach blutseitigem Angebot, keine signifikante Veränderung.

Bei steigendem pH-Wert des Inkubationsmediums wird eine Tendenz zur Erhöhung des Feuchtgewichtes deutlich (Tab.24). Dieser statistisch nicht zu belegende Effekt erklärt sich aus einer, zwischen den pH-Werten von 6,48 und 7,82 signifikanten, Änderung des lumenseitigen ER, der bei dem pH-Wert von 7,82 mit 22,66 %

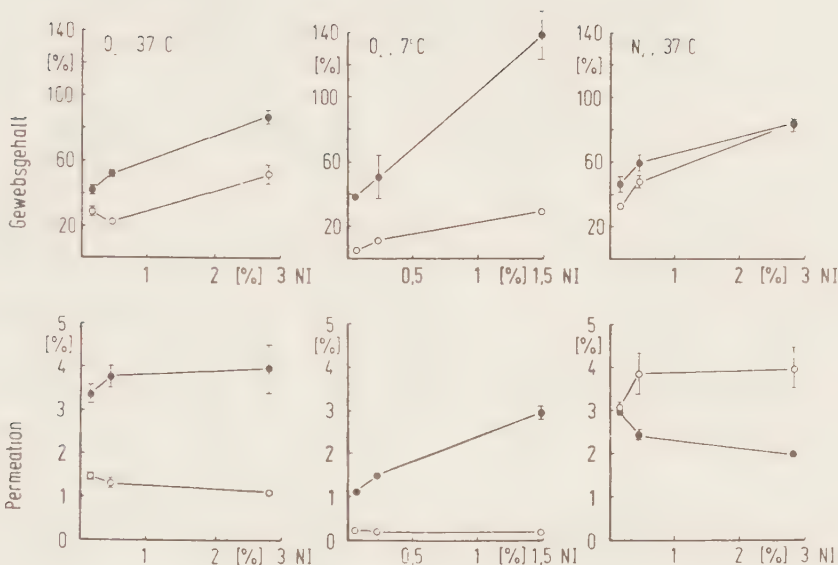


Abb. 21: Abhängigkeit von Gewebsgehalt (oben) und Permeationsraten (unten) vom Anteil der freien Säure bei Versuchsbeginn bei einem lumen- (offene Symbole) oder blutseitigem Angebot (geschlossene Symbole) von 10 µM PABA. Krebs-Hepes-Glukose-Mannit Puffer, pH= 6,48, 7,27, 7,82. Jeder Wert entspricht vier Versuchen.

seinen höchsten Wert erreicht. Der Gesamt-ER beträgt für den pH-Wert 6,48 32,82 %, für 7,27 32,74 % und für 7,82 41,40 %. Die Steigerung des pH-Wertes der Inkubationslösung bewirkt eine Erhöhung der parazellulären shunt-Permeabilität. Eine Steigerung des PEG-Flusses nach lumenseitigem Angebot läßt sich zwischen den pH-Werten der Inkubationslösung von 6,48 (Tab.24, 1.Spalte) und 7,82 (Tab.24, 5.Spalte) statistisch belegen.

Eine Erhöhung des Feuchtgewichtes unter Einfluß einer anaeroben Inkubation oder in einer Inkubation bei 7°C konnte mit Hepes-Puffern verschiedener pH-Werte, anders als beim Tris-Puffer, nicht festgestellt werden. Dabei sind die Vergleichsgruppen jedoch nur klein und die entsprechenden Versuche wurden jeweils nur an

Tab.24 : Extrazellulärräume, Gewebsgehalt und Permeationsraten bei lumen- oder blutseitig gegebenen 10 μ M PABA am Meerschweinchen-Jejunum Krebs-Hepes-Glukose-Mannit Puffer, 37°C, Sauerstoffbegasung
Stat. Vergleich (*-***): Angebotsseite Lumen gegen Blut, (o-ooo) gegen nächst niederen pH-Wert gleicher Angebotsseite

Puffer pH		6,48		7,27		7,82	
FG	(mg)	11,32		12,06 ^{ns}		12,67 ^{ns}	
	S.E.M.	0,44		0,55		0,70	
	N	8		8		8	
Angebotsseite		Lumen		Lumen		Lumen	
ER	(ul)	1,84		2,05		3,08	
	S.E.M.	0,31		0,20 ^{ns}		0,45 ^{ns}	
ER	(%FG)	15,51		17,79		22,66	
	S.E.M.	1,61		1,11 ^{ns}		1,87 ^{ns}	
Gewebsgehalt (%)		52,01		22,89		28,73	
	S.E.M.	6,14		1,58 ^o		1,98 ^{ns}	
Permeation (%)		1,017		1,327		1,481	
	S.E.M.	0,088		0,112 ^{ns}		0,057 ^{ns}	
PEG %		0,285		0,370		0,409	
	S.E.M.	0,004		0,043 ^{ns}		0,050 ^{ns}	
N		4		4		4	

Präparaten eines Tieres durchgeführt, so daß eine sichere statistische Aussage nicht möglich scheint. Dagegen konnte die schon beim Tris-Medium beobachtete Verminderung der shunt-Permeabilität bei 7°C wie auch die Steigerung der shunt-Permeabilität unter Anaerobiose im Bereich aller pH-Werte beobachtet werden.

5.4.2. Permeation und Gewebsgehalte von PABA

Bei einem Vergleich der Gewebsgehalte und der Permeation von PABA mit den Werten des Krebs-Tris Mediums (pH=7,00) bietet sich die Wertegruppe des Krebs-Hepes Mediums mit einem pH-Wert von 7,27 an (Abb.20). Bezieht man die unterschiedlichen pH-Werte der Medien mit in die Analyse ein, so wird die gute Reproduzierbarkeit der beobachteten Phänomene in Abb.20 deutlich. Auch unter Einfluß des Hepes-Puffers ist dabei eine Netto-Sekretion bei 37°C und Sauer-

stoffbegasung, eine Netto-Resorption bei 37°C und Anaerobiose wie auch die bei 7°C und Sauerstoff erhalten gebliebene Netto-Sekretion zu beobachten. Die Asymmetrie der Gewebsgehalte in Abhängigkeit von der Angebotsseite verstärkte sich analog zu den Krebs-Tris Werten bei einer Inkubationtemperatur von 7°C und wurde, bedingt durch einen Anstieg des Gewebsgehaltes nach lumenseitigem Angebot, geringer unter Einfluß der Anaerobiose.

Der pH-Wert des Inkubationspuffers bestimmt den Anteil an nicht-ionisierter Substanz im Inkubationsmedium. Dabei verändert sich der Anteil an nicht-ionisiertem PABA bei pH-Werten von 6,48, 7,27 und 7,82 von 2,74 % über 0,466 % auf 0,129 % um den Faktor 21, wohingegen der Anteil an ionisiertem PABA mit 97,26 bis 99,87 % wenig verändert ist. Das Hepes-Medium erweist sich gegenüber pH-Wert-Änderungen vergleichsweise stabiler als das Tris-Medium.

Tab.25 : Einfluß von Anaerobiose und Kälte auf Gewebsgehalt und Permeationsraten bei lumen-oder blutseitig gegebenen 10 µM PABA am Meerschweinchen-Jejunum bei unterschiedlichen pH-Werten des Krebs-Hepes-Glukose-Mannit Puffers, Stat. Vergleich (*-**) Angebotsseite Lumen gegen Blut, (o-ooo) gegen nächst niederen pH-Wert gleicher Angebotsseite

Puffer pH		6,48		7,27		7,82	
Angebotsseite		Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
Aerob, 7°C							
Gewebsgehalt (%)		30,34	138,69***	11,86	50,29*	6,23	38,83***
	S.E.M.	2,48	15,13	0,89°°°	13,62°°	0,47°°	0,90 ^{ns}
Permeation (%)		0,174	2,096***	0,225	1,448***	0,240	1,114***
	S.E.M.	0,061	0,192	0,091 ^{ns}	0,102°	0,082 ^{ns}	0,044°
N		4	4	4	4	4	4
Anaerob, 37°C							
Gewebsgehalt (%)		83,19	84,19 ^{ns}	48,37	59,83 ^{ns}	32,92	46,42*
	S.E.M.	3,64	3,43	3,76°°°	5,04°°	1,19°°	4,73 ^{ns}
Permeation (%)		3,966	1,984**	3,836	2,488*	3,043	2,956 ^{ns}
	S.E.M.	0,475	0,062	0,462 ^{ns}	0,110°°	0,119 ^{ns}	0,070°
N		4	4	4	4	4	4

Nach 45 minütiger Inkubation unter aeroben Versuchsbedingungen ist der pH-Wert des lumenseitigen Inkubates mit $7,267 \pm 0,003$, $N=4$, unverändert, während der pH-Wert des blutseitigen Inkubates mit $7,220 \pm 0,001$, $N=4$, in den sauren Bereich verschoben ist. Die hier zu beobachtende Polarität der Abgabe saurer Äquivalente zur Blutseite kann, wie beim Tris-Medium, unter Anaerobiose aufgehoben werden, wobei sich die pH-Werte sowohl der Lumenseite mit $7,215 \pm 0,003$, $N=4$, wie der der Blutseite mit $7,208 \pm 0,003$, $N=4$, in die saure Richtung verschieben. Die insgesamt nur geringfügigen pH-Wert Änderungen des Puffers gegenüber den Differenzen der pH-Werte der verschiedenen Inkubationsmedien lassen eine Auftragung der Permeation und des Gewebsgehaltes gegen den Anteil an nicht-ionisierten PABA am Versuchsbeginn (Abb.21) gerechtfertigt erscheinen.

Eine Analyse der Permeationsraten des PABA ergibt, unabhängig von der Versuchsbedingung wie Anaerobiose oder Temperatur, eine von der Vorzugsrichtung des Transportes abhängige Änderung der Permeationsraten mit dem pH-Wert des Mediums (Abb.21,Tab.24,25). Dabei steigt die Permeationsrate in der Vorzugsrichtung -also in sekretorischer Richtung für die aerobe und in resorptiver Richtung für die anaerobe Versuchsbedingung- mit steigendem Anteil an nicht-ionisierter Säure. Die Permeationsraten in der Gegenrichtung sinken dagegen im Bereich der acideren pH-Werte. Diesem Phänomen liegt dabei jedoch keine Steigerung der transzellulären Permeation des Substrates, sondern eine im alkalischen Bereich gesteigerte shunt-Permeabilität zugrunde. Im Bereich des am stärksten alkalischen Mediums kann in der anaeroben Versuchsbedingung die Netto-Resorption vollständig unterdrückt werden (Tab.25).

Annähernd linear zum pH-Wert des Mediums verändern sich die Gewebsgehalte und die Permeationsraten nach blutseitigem Angebot der bei 7°C inkubierten Versuchskammern (Abb.21,Tab.25). Dagegen ist die bei 37°C unter der aeroben Versuchsbedingung nach blutseitigem Angebot wie auch für die unter Anaerobiose nach lumenseitigem Angebot zu beobachtende Steigerung der Gewebsgehalte zwischen 7,27 und 6,48 von keiner vergleichbaren Steigerung der Permeationsrate

begleitet. Parallel hierzu nehmen die nicht auf die Marker-Permeation korrigierten Permeationsraten zwischen dem pH-Wert von 7,82 und 7,27 schneller ab als zwischen den pH-Werten von 7,27 und 6,48. Zusammenfassend reagiert das System der isolierten Mukosa bei einer Inkubationstemperatur von 37°C in seinen Permeationsraten stärker auf eine Veränderung des pH-Wertes der Puffer zum alkalischen als zum sauren Bereich.

5.5. Einfluß lumenseitiger hyperosmolarer Vorinkubation

Bei der Untersuchung der Metabolisierung unter Einfluß einer lumenseitigen hyperosmolaren Vorinkubation mit 2 Osmol/l Natrium-cyclamat konnte ein Anstieg des resorptiven Flusses beobachtet werden (Kap.3.1.3.2). Dies führte zu weiteren Versuchen, in denen, abhängig von der Konzentration des Cyclamats, der Einfluß der hyperosmolaren Vorinkubation auf die Permeation des PABA, insbesondere jedoch auch der Einfluß auf die, in den Metabolisierungsexperimenten nicht untersuchte, extrazelluläre Permeation der Markersubstanz untersucht werden sollte.

Die steigende Konzentrationen des Cyclamats in der Vorinkubation bewirkte einen konzentrationsabhängigen Effekt auf Feuchtgewicht und Extrazellulärraum, jedoch keinen Effekt auf die Permeationsrate des PEG (Abb.22,Tab.26). Aus diesem Grunde scheidet die Möglichkeit einer unspezifischen Schädigung der Mukosae und eine damit verbundene Steigerungen der extrazellulären Permeation des PABA als Basis der beobachteten Phänomene aus. Die statistisch nicht belegbare Steigerung im Feuchtgewicht ist in einem Anstieg der extrazellulären Räume begründet; vor allem der lumenseitige extrazelluläre Raum erhöhte sich dabei zwischen 1 und 2 Osmol/l Cyclamat im absoluten Wert statistisch hochsignifikant um 2,24 µl. Der blutseitige Raum war zwischen beiden Cyclamat-Konzentrationen mit 1,33 µl ebenfalls, statistisch belegbar, vergrößert.

Gleiche Permeationsraten des PABA in beiden Richtungen konnten erst bei einer Cyclamat-Konzentration von 2 Osmol/l erreicht

werden (Abb.22,Tab.26). Dabei stiegen einerseits die Permeationsraten in resorptiver Richtung um das Doppelte, wohingegen die Permeationsraten in sekretorischer Richtung halbiert waren. Gleichzeitig zu den in beiden Richtungen signifikanten Änderungen der Permeation änderten sich auch die Gewebsgehalte. Eine ansteigende Konzentration der lumenseitigen Vorinkubationslösung führte bei blutseitigem Angebot zu einem statistisch signifikanten Anstieg im Gewebsgehalt. Der Gewebsgehalt nach lumenseitigem Angebot nahm dagegen -ebenfalls statistisch belegbar- mit steigender Cyclamat-Konzentration ab.

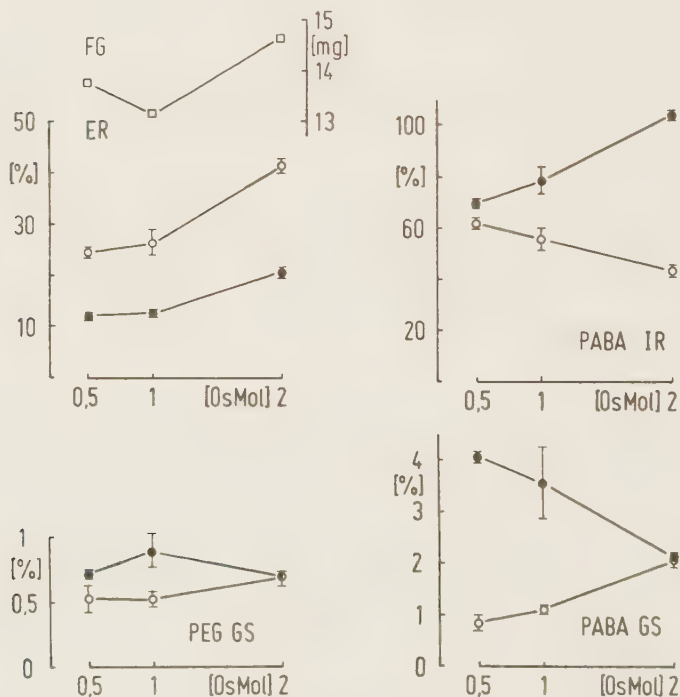


Abb. 22: Einfluß einer lumenseitigen hyperosmolaren Vorinkubation mit 0,5-2 Osmol/l Natriumcyclamat auf Feuchtwicht (FG, links oben), Extrazellulärraum (ER, links Mitte), PEG-Permeation (PEG GS, links unten), Gewebsgehalt (PABA IR, rechts oben) und Substrat-Permeation (PABA GS, rechts unten) von 10 μ M PABA, das lumenseitige Angebot ist mit offenen, das blutseitige mit geschlossenen Kreisen symbolisiert; jeder Wert repräsentiert zwei bis neun Versuche

Tab.26 : Extrazellulärräume, Gewebsgehalt und Permeationsraten von 10 μ M PABA nach lumenseitiger hyperosmolaren Vorinkubation mit 0,5 bis 2 Osmol Natriumcyclamat, Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer; Stat. Vergleich (*-**) Angebotsseite Lumen gegen Blut, (o-ooo) gegen nächst niederen Konzentration der Vorinkubation bei gleicher Angebotsseite

Natriumcyclamat (Osmol/l)		0,50		1,00		2,00	
Feuchtgewicht(mg)		13,77		13,15 ^{ns}		14,66 ^{ns}	
S.E.M.		0,46		1,06		0,43	
N		6		6		18	
Angebotsseite		Lumen		Blut		Lumen	
Extrazell.		Lumen		Blut		Lumen	
(% FG)		24,60		12,05***		26,66	
S.E.M.		1,01		0,54		2,72 ^{ns}	
N		3		3		3	
Gewebsgehalt (%)		61,99		69,70*		56,32	
S.E.M.		1,91		0,76		4,58 ^{ns}	
N		3		3		3	
Permeation (%)		0,870		4,001***		1,106	
S.E.M.		0,147		0,108		0,043 ^{ns}	
N		3		3		2	
PEG900 (%)		0,527		0,730*		0,526	
S.E.M.		0,101		0,012		0,059 ^{ns}	
N		3		3		2	

5.6. Versuche zur Inhibition der Netto-Sekretion über blutseitig gegebenes Phenoxybenzamin

Wie aus vergleichbaren Untersuchungen zur Netto-Sekretion am isolierten Meerschweinchen-Jejunum bekannt ist (Lauterbach, 1983), vermag Phenoxybenzamin (PBA) den Sekretionsmechanismus des β -Naphtholorange, nicht jedoch die Netto-Sekretion der Salicylsäure zu hemmen. Im Rahmen dieser Studie wurde daher der Einfluß von PBA auf die Sekretion des PABA untersucht, als Vergleichssubstrat wurde β -Naphtholorange eingesetzt.

Um eine möglichst vollständige Hemmwirkung zu erzielen, war es notwendig, die Kammern vor der Inkubation mit dem jeweiligen Substrat zwei Stunden mit PBA im blutseitigen Inkubationsmedium zu inkubieren. Zur Kontrolle wurden Kammern ohne Vorinkubation und

Versuchskammern, die mit Vorinkubationspuffer ohne PBA zwei Stunden vorinkubiert wurden, mitgeführt.

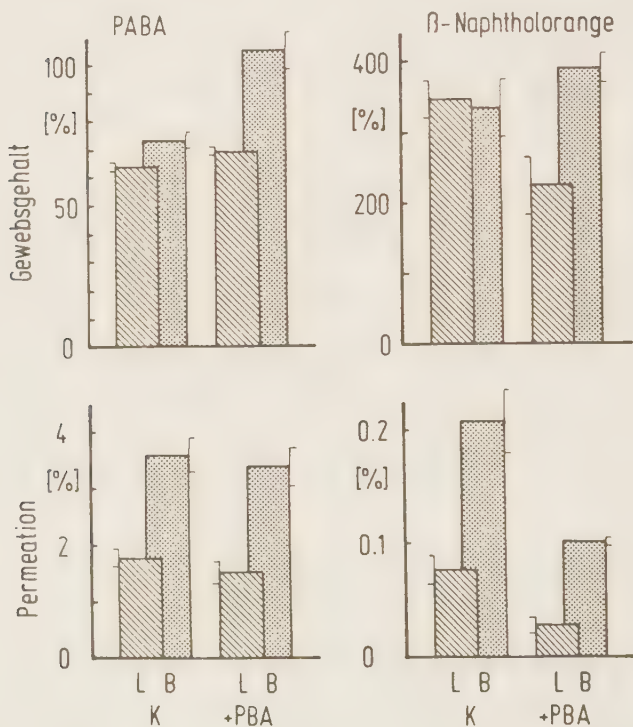


Abb. 23: Gewebsgehalt (oben) und Permeationsraten (unten) von 10 μ M PABA (linke Bildhälfte) und 10 μ M β -Naphtholorange (rechte Bildhälfte) ohne (K) und mit (+PBA) blutseitig gegebenem PBA; alle Kammern wurden 120 min vorinkubiert; Anzahl Werte je Säule s.Tab.27,28 (L) lumen- (B) blutseitiges Substratangebot

5.6.1. PBA und PABA

Vergleicht man die Kammern mit und ohne Vorinkubation (Tab.27), so ist der Gewebsgehalt nach lumenseitigem Angebot gegenüber den nicht vorinkubierten Versuchsansätzen statistisch hochsignifikant erhöht. Die Steigerung der Permeation in resorptiver Richtung erklärt sich zwanglos aus der in diesem Fall fast dreifach höheren shunt-Permeabilität (Tab.27). Die Permeationsrate in sekretorischer Richtung ist -wenn auch statistisch nicht signifikant- gegenüber den Kontrollen leicht erniedrigt.

Die Permeationsraten des PABA konnten durch PBA weder in resorptiver noch in sekretorischer Richtung beeinflusst werden (Abb.23, Tab.27). Dagegen war der Gewebsgehalt nach blutseitigem Angebot um 42 % gegenüber den vorinkubierten Kontrollen statistisch signifikant erhöht. Alle passiven Parameter wie Feuchtgewicht und Extrazellulärraum blieben unverändert.

Tab.27 : Gewebsgehalt und Permeationsraten von 10 µM PABA nach zweistündiger Vorinkubation (VK) mit und ohne 110 µM blutseitig zugegebenem Phenoxybenzamins (PBA+VK), Stat.Vergleich (*-***). Angebotsseite Lumen gegen Blut, (o-ooo) Kontrolle+VK gegen Kontrolle und PBA+VK gegen Kontrolle+VK bei gleichen Angebotsseiten

Vorinkubation		Kontrolle		Kontrolle + VK		PBA + VK	
Angebotsseite		Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
Gewebsgehalt (%)		32,69	74,68***	63,96	74,23*	69,69	105,05**
S.E.M.		4,12	3,04	1,73ooo	2,84ns	1,24o	6,77oo
Permeation PABA (%)		0,775	4,178***	1,776	3,586***	1,510	3,368***
S.E.M.		0,105	0,498	0,177oo	0,293ns	0,172ns	0,325ns
PEG 900 (%)		0,253	0,888***	0,778	0,694ns	0,721	0,702ns
S.E.M.		0,035	0,083	0,097oo	0,054ns	0,087ns	0,040ns
N		4	4	6	6	6	6

5.6.2. PBA und β -Naphtholorange

Für β -Naphtholorange konnte in den Versuchen eine Netto-Sekretion nachgewiesen werden (Abb.23,Tab.28). Im Vergleich zu Untersuchungen von Lauterbach (1983) fallen die in beiden Richtungen um etwa den Faktor 6 niedrigeren Permeationsraten auf. Unter Einfluß der zweistündigen Vorinkubation erniedrigte sich die Permeationsrate in sekretorischer Richtung signifikant. Der Gewebsgehalt war um 15 % nach blutseitigem Angebot leicht und nach lumenseitigem Angebot um 133 % sehr deutlich bei den vorinkubierten Kammern erhöht.

Tab.28 : Gewebsgehalt und Permeationsraten von 10 μ M β -Naphtholorange nach zweistündiger Vorinkubation (VK) mit und ohne 110 μ M blutseitig zugegebenem Phenoxybenzamins (PBA+VK), Stat.Vergleich (*-****) Angebotsseite Lumen gegen Blut, (o-ooo) Kontrolle+VK gegen Kontrolle und PBA+VK gegen Kontrolle+VK bei gleichen Angebotsseiten

Vorinkubation		Kontrolle		Kontrolle + VK		PBA + VK	
		Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
Angebotsseite							
Gewebsgehalt (%)		149,9	289,9*	347,7	334,1 ^{ns}	225,5	389,7*
	S.E.M.	49,9	41,0	27,3 ^o	41,4 ^{ns}	40,0 ^{ns}	20,5 ^{ns}
Permeation β -Naphtholorange (%)		0,046	0,563 ^{ns}	0,077	0,207*	0,028	0,101 ^{***}
	S.E.M.	0,001	0,237	0,013 ^o	0,029 ^{ns}	0,006 ^o	0,003 ^o
PEG 900 (%)		0,309	0,618*	0,608	0,614 ^{ns}	0,360	0,589 ^{ns}
	S.E.M.	0,118	0,030	0,035 ^o	0,065 ^{ns}	0,074 ^o	0,038 ^{ns}
	N	2	2	3	3	3	3

Unter Einfluß von blutseitig gegebenem PBA war die Permeationsrate in sekretorischer Richtung signifikant um 50 % reduziert. Die Permeationsrate nach lumenseitigem Angebot war dagegen -bezieht man hier die PEG-Permeation in die Analyse mit ein- gegenüber den Kontrollen wenig verändert; sowohl der Substratfluß wie die PEG-Permeation waren bei den PBA-Werten in diesem Fall um rund die Hälfte vermindert. Die Veränderungen der Gewebsgehalte unter Einfluß von PBA -Erhöhung nach blutseitigem und Reduktion nach lumenseitigem Angebot- ließen sich statistisch nicht absichern.

5.7. Efflux von PABA

In den Versuchen zur Metabolitenverteilung von PABA am Jejunum wurde der überwiegende Anteil an Ac-PABA immer zu der jeweiligen Angebotsseite abgegeben. Als Erklärung dieses Befundes können zwei Mechanismen diskutiert werden: eine Kompartimentierung der Mukosa in einen nur lumen- und einen nur blutseitig erreichbaren Raum oder eine trans-Stimulation der Abgabe von Metabolit über das Substrat im Angebotsmedium.

Beide Möglichkeiten wurden in einer Serie von Effluxversuchen mit lumen- oder blutseitig in der Standard-Inkubationsbedingung (45 min, Sauerstoff, 37°C, Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer pH 7,00) vorbeladenen Mukosae untersucht. Um eine möglichst hohe intrazelluläre Konzentration des radioaktiven Tracers zu erreichen, wurden zur Vorbeladung 100 μM ^{14}C -PABA in einer spezifischen Aktivität von 24 mCi/mmol (Batch 9) eingesetzt. Zu der Kontrolle je einer lumen- oder blutseitig vorbeladenen Mukosa wurde in einem Versuch 2 mM unmarkiertes PABA dem lumenseitigen, in einem weiteren Versuch 2 mM PABA dem blutseitigen Effluxmedium zugegeben. Nach Abschluß der 120minütigen Effluxperiode fanden sich in keinem Fall Reste des Tracers im Gewebe. Die Zusammensetzung des zur Lumen- oder Blutseite abgegebenen Tracers konnte aufgrund der geringen Aktivitäten nicht bestimmt werden. Aus den Untersuchungen zur Metabolisierung (3.1.4.1) kann jedoch geschlossen werden, das aus dem intrazellulären Raum abgegebene Aktivität vollständig durch den Metaboliten Ac-PABA repräsentiert wird.

Der Efflux eines Substrates aus einem homogenen Raum läßt sich über die Änderung der Effluxgeschwindigkeit gegen die Zeit darstellen. Halblogarithmisch aufgetragen, ergibt sich dabei, entsprechend der zugrundeliegenden Exponentialfunktion, eine Gerade. Ein Efflux aus verschiedenen Kompartimenten des Versuchssystems, wie beispielsweise der Kammerinnenfläche und dem intrazellulären Raum der Mukosa, läßt sich als Summe der Exponentialfunktionen dieser Räume beschreiben und über die Methode des exponentiellen Peelings (vgl.2.10.3.) berechnen. Im eingesetzten Versuchssystem

konnten dabei Effluxfunktionen, die aus bis zu drei Exponentialgleichungen zusammengesetzt waren, bestimmt werden. Aus den Einzelfunktionen wurden jeweils die im Versuchsverlauf zwischen Null und 120 min aus den Einzelräumen abgegeben Aktivitäten wie die Halbwertszeiten dieser Abgabe errechnet (vgl. 2.10.3, Tab. 29). Die Identifikation eines bestimmten Raumes des Versuchssystems mit einer dieser Effluxfunktionen erscheint schwierig. Relativ sicher entspricht das erste Kompartiment mit einer Halbwertszeit zwischen

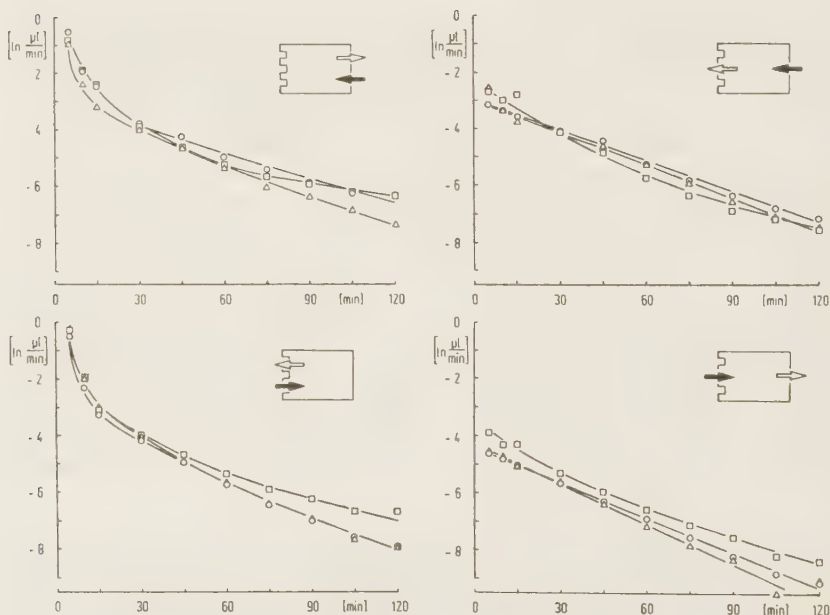


Abb. 24: Efflux von PABA nach blut- (obere Bildhälfte) oder lumenseitiger (untere Bildhälfte) Vorbeladung mit 100 μM PABA zur jeweiligen Angebots- (linke Bildhälfte) oder Gegenseite (rechte Bildhälfte) in ein Medium ohne ($\circ$) oder mit 2 mM nichtmarkiertem PABA im lumen- ($\square$) oder blutseitigem (Δ) Effluxpuffer. Die Seite der Vorbeladung ist in den Schemata über einen gefüllten, die Seite des Effluxes über einen offenen Pfeil angedeutet. Jeweils ein lumen- und blutseitiger Verlauf entspricht einem Versuch

1,03 und 3,47 min dem PABA, welches aus der Kammer und von der Oberfläche der Mukosa ausgewaschen wurde. In anderen Experimenten zur Permeation von PABA wurde der Gewebsgehalt an Tracer nach Versuchsende über eine Extraktion der Mukosae direkt bestimmt. Ohne Korrektur auf extrazelluläres Substrat finden sich dabei 4,14 +/- 0,411 µl, N=8, nach lumenseitigem Angebot und 4,81 +/- 0,47 µl, N=8, nach blutseitigem Angebot in den Mukosae. Nach einer Korrektur lassen sich intrazelluläre Anteile von 2,84 +/- 0,154 µl, N=6 nach lumen- und 4,11 +/- 0,29 µl, N=6, nach blutseitigem Angebot bestimmen. Die aus dem Kompartiment I ausgetretene Menge an PABA übersteigt somit bei lumen- wie bei blutseitiger Vorbeladung die im Enterocyten zu erwartende Menge an PABA.

Tab.29 : Efflux von PABA aus mit 100 µM ^{14}C -PABA lumen-(1,2,3) oder blutseitig (4,5,6) 45 min vorbeladenen Mukosae zur Lumen- und Blutseite; 2 mM unmarkiertes PABA im blut- (2 u.5) oder lumenseitigem (3 u.6) Effluxmedium. (*) Übereinstimmung zwischen der Seite des Effluxes und dem unmarkierten PABA im Effluxmedium; (VS) Vorbeladungsseite; jede Versuchsbedingung wird durch eine Versuchskammer repräsentiert.

Kompartiment	I		II		III	
	Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
Halbwertszeit (min)						
VS Lumen (1)	1,048	-----	8,868	-----	19,10	17,12
(2)	1,026	-----*	8,116	-----*	19,98	14,59*
(3)	1,556*	-----	8,371*	8,494	27,73*	22,88
VS Blut (4)	-----	3,466	-----	-----	19,25	23,26
(5)	-----	1,064*	-----	9,267*	18,00	21,87*
(6)	-----*	2,237	9,508*	8,526	27,08*	50,60
Volumen (µl)						
VS Lumen (1)	30,39	-----	0,919	-----	0,693	0,287
(2)	41,40	-----*	1,570	-----*	0,604	0,290*
(3)	13,49*	-----	1,430*	0,249	0,688*	0,264
VS Blut (4)	-----	5,53	-----	-----	1,359	1,553
(5)	-----	17,34*	-----	0,977*	1,296	0,867*
(6)	-----*	5,22	1,210*	2,169	0,425*	0,536

Addiert man die aus Kompartiment II und III ausgetretene Menge an Tracer, so ergibt sich für die Inkubate mit lumenseitiger Vorbeladung eine Summe von 1,90 (1), 2,46 (2) und 2,63 µl (3, Tab.29). Entsprechend lassen sich für die blutseitige Vorbeladung Werte von 2,91 (4), 3,16 (5) und 4,34 µl (6) errechnen (Tab.29). Diese Werte

entsprechen in etwa dem intrazellulären Gehalt der Mukosae in der Vergleichsbedingung.

Bei einer Vorbeladung der Mukosae von der Lumenseite hat unmarkiertes PABA im Effluxmedium keinen Einfluß auf den Efflux von PABA (Abb.24,Tab.29). Das zweite Kompartiment mit einer Halbwertszeit von rund 8 min erscheint fast ausschließlich auf der Lumenseite, d.h. der Seite des Angebotes, (Tab.29); die bei (3) (vgl.Tab.29) aus Kompartiment II zur Blutseite abgegebene Menge an PABA ist mit 0,25 μ l gegenüber der zur Lumenseite abgegebenen Menge von 1,43 μ l gering. Im dritten Kompartiment mit einer Halbwertszeit von 15 bis 25 min wird -für alle Einzelbedingungen gleich- 70 % der Aktivität nach lumenseitiger Vorbeladung zur Lumenseite abgegeben (Tab.29). Damit spricht dieser Befund gegen die Möglichkeit der trans-Stimulation des Transportes in der apikalen Membran. Wahrscheinlicher erscheint dagegen die Hypothese eines lumenseitig erreichbaren Raumes, aus dem aus dem PABA leichter in die lumenseitige als in die blutseitige Effluxlösung austritt.

Nach blutseitiger Vorbeladung der Mukosae ergab sich kein so einheitliches Bild wie bei dem lumenseitig vorbeladenen Gewebe. Die Summe des aus Kompartiment II und III zu der Angebotsseite, also der Blutseite, abgegebenen Tracers ist jedoch im Mittel aller Versuchsbedingungen auch in diesem Fall mit einem Anteil von 69,7 % der Gesamtmenge größer als im Medium der Gegenseite (Tab.29). Eindeutige Hinweise auf einen Effekt von unmarkiertem PABA im Effluxmedium ergeben sich auch bei einer blutseitigen Vorbeladung nicht.

5.8. Permeation und Gewebsgehalt von N-Acetyl-PABA als Substrat

Ac-PABA ist mit einem pK_a -Wert von 4,23 eine stärkere Säure als PABA. Eine Steigerung der Angebotskonzentration von PABA und eine damit verbundene Verminderung des Anteils des Metaboliten am Tracer im Gewebe bewirkt keine proportionale Änderung in der Summe

des zur Gegenseite übergetretenen Tracers. Danach sollten Ac-PABA und PABA trotz eines unterschiedlichen Anteils der freien Säure ähnliche Permeabilitäten aufweisen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde in einer Versuchsserie radioaktiv markiertes Ac-PABA synthetisiert und direkt als Substrat mit einer Konzentration von 0,01, 0,1 und 2 mM in einem Krebs-Tris-Glukose-Mannit Medium eingesetzt. In Vorversuchen zur Metabolisierung des Ac-PABA konnte weder eine Desacetylierung noch eine andere Metabolisierungsreaktion beobachtet werden.

Die Permeationsraten von Ac-PABA sind in allen Konzentrationen in sekretorischer Richtung signifikant höher als in resorptiver Richtung (Abb.25,Tab.30). Die Gewebsgehalte sind, in der Tendenz vergleichbar mit PABA, in diesem Konzentrationsbereich nach blutsei-

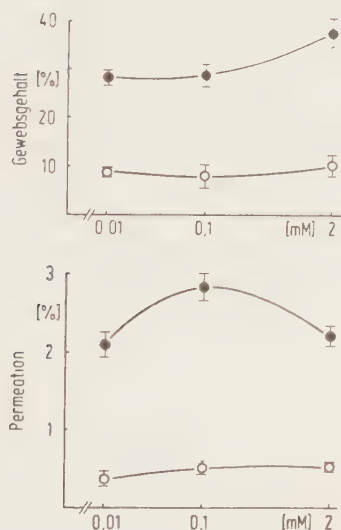


Abb. 25: Gewebsgehalt und Permeationsraten von 0,01 bis 2 mM N-Acetyl-PABA nach blut- (geschlossene Kreise) oder lumenseitigem (offene Kreise) Angebot am Meerschweinchen-Jejunum, Anzahl der Einzelwerte pro aufgetragenen Wert vgl. Tab.30

tigem Angebot immer höher als nach lumenseitigem Angebot. Gegenüber PABA sind die Permeationsraten von Ac-PABA sowohl in resorptiver als auch sekretorischer Richtung deutlich geringer. Bezieht man den Vergleich der Permeationsraten jedoch nicht auf die Kapazität, sondern auf die Flux-Ratio als Verhältnis beider Flußraten, so wird eine stärkere Permeationsasymmetrie für den Metaboliten deutlich.

Tab. 30: Gewebsgehalt und Permeationsraten nach 45 minütiger Inkubation lumen- oder blutseitig gegebenem Ac-PABA am Meerschweinchen-Jejunum Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer, pH=7,00, O₂, 37°C; Stat.Vergleich: (*-****) Angebotsseite Lumen gegen Blut, (o-ooo) gegen nächst niedrigere Konzentration gleicher Angebotsseite

Konzentration (mM)	0,01		0,10		2,00	
	Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
Gewebsgehalt (%)	8,75	28,36***	8,09	28,72**	10,35	37,52***
S.E.M.	0,92	1,30	2,46 ^{ns}	2,56 ^{ns}	2,11 ^{ns}	2,93 ^{ns}
N	10	10	3	5	4	4
Permeation (%)	0,374	2,087***	0,509	2,827***	0,526	2,204***
S.E.M.	0,091	0,161	0,082 ^{ns}	0,176 ^o	0,047 ^{ns}	0,130 ^o
	10	10	3	5	4	3

Die Permeation nach blutseitigem Angebot hat ein statistisch absicherbares Maximum bei einer Angebotskonzentration von 100 µM. Der relative Gewebsgehalt nimmt nach blutseitigem Angebot bei steigender Angebotskonzentration zu. Bei lumenseitigem Angebot sind dagegen im untersuchten Konzentrationsbereich sowohl der Gewebsgehalt wie auch die Permeationsrate unabhängig von der Angebotskonzentration.

6. Diskussion der Permeationsmechanismen am Jejunum

6.1. Passive Parameter und Homogenität der Methode der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums

Neben den substratspezifischen Parametern wie Permeationsrate und Gewebsgehalt wurden in den Untersuchungen zur Permeation ebenfalls die Verteilung des Markers PEG900 und das Feuchtgewicht ermittelt. Ein Vergleich dieser Parameter mit Angaben anderer Autoren (Turnheim und Lauterbach, 1977a, Lauterbach, 1977, Sund und Lauterbach, 1978, Sprakties, 1983, Fischer und Lauterbach, 1983, Fries, 1986) zeigt eine gute Übereinstimmung dieser Werte und spricht für eine gute Reproduzierbarkeit des Versuchsmodells der isolierten Mukosa.

Die parazelluläre Permeationsrate der Markersubstanz ist dabei in beiden Richtungen verschieden; PEG900 tritt bei blutseitigem Angebot stärker als bei lumenseitigem Angebot zur Gegenseite über. Eine ähnlich asymmetrische Markerpermeation konnte neben den Studien am gleichen Präparat (vgl. Tab. 9a, b) auch für Inulin am Jejunum des Ochsenfrosches (Chalfin und Mitarbeiter, 1958), für Mannit an der isolierten Dünndarmmukosa des Kaninchens (Bihler und Crane, 1962) wie auch für Polyäthylenglykol am Rattenjejunum (Munk, 1976) beobachtet werden. Grundlage dieses Phänomens könnte nach Überlegungen von Parsons (1968) die laterale Verbindung der Enterocyten sein, welche blutseitig wirkenden Drücken eine Scherwirkung unter Erweiterung der Interzellularräume erlaubt. Lauterbach (1977a) diskutiert in diesem Zusammenhang die Möglichkeit eines asymmetrischen, minimalen Abpressens des Inkubationsmediums. Für dieses "mechanische" Modell spricht dabei, daß diese Permeationsasymmetrie auch in einer anaeroben Inkubation unabhängig von einer Energetisierung des Gewebes beobachtet werden konnte.

Von allen Parametern erwies sich die shunt-Permeabilität als der am stärksten über die Versuchsbedingung zu beeinflussende Wert. So konnte in der aeroben Inkubation im Tris-Medium nur bei der PEG-Permeation eine Korrelation zum Tiergewicht oder zu der Lage des Darmstückes beobachtet werden. Ob dabei die höhere Permeabi-

lilität der distaleren Darmabschnitte funktionell oder in der späteren Entnahme dieses Materials begründet ist, kann nicht entschieden werden.

Eine erhöhte shunt-Permeabilität fand sich auch bei der anaeroben Inkubation und im Bereich alkalischer pH-Werte des Inkubationsmediums. Beide Befunde, die auch von anderen Autoren beschrieben wurden (Anaerobiose: Lauterbach und Turnheim, 1977a, Sund und Lauterbach, 1983, Sprakties, 1983, alk. pH-Wert: Lauterbach, 1987) könnten in einer Schädigung des Gewebes begründet liegen.

Bei einer Inkubation bei 7°C kommt es zu einer ausgeprägten Herabsetzung der shunt-Permeabilität, die sich aus dem Einfluß der Temperatur auf die Diffusionskonstante ergeben könnte. Der im Mittel mit 1,7 relativ hohe Q_{10} -Wert im Vergleich zur Permeation bei 37°C läßt jedoch auch die Möglichkeit weiterer Mechanismen der Einschränkung der PEG-Permeation bei 7°C offen. Höfer (1977) diskutiert als Beurteilungskriterium der Q_{10} -Werte den Bereich von 1,03-1,3 als Hinweis auf rein physikalische Phänomene und den Bereich zwischen 2 und 4 als Hinweis auf eine biochemische Reaktion. Damit liegt der Q_{10} -Wert des Jejunums zwischen beiden Bereichen, während der Wert des Colons mit 1,14 eher für ein physikalisches Phänomen spricht.

Eine anaerobe Inkubation, eine Inkubation im Bereich alkalischer pH-Werte oder eine lumenseitig hyperosmolare Vorinkubation führten zu einer Vergrößerung des lumenseitigen extrazellulären Raumes. Diese Steigerung könnte zum einen in einer verstärkten Mucossekretion, aber auch in der Zerstörung von Zellen des Villus-Spitzenbereiches begründet sein. Die anaerobe Inkubation führte über diesen Effekt hinaus zu einer erhöhten Wasseraufnahme in den Enterocyten.

6.2. Permeation von PABA und Ac-PABA

Bei der Untersuchung der Permeationsmechanismen des PABA am Jejunum wurden eine Reihe von Versuchen ohne anschließende Metabolitenauftrennung durchgeführt. Permeationsraten und Gewebsgehalte entsprechen dabei immer der Summe aus Ausgangssubstrat und Metabolit.

6.2.1. Netto-Sekretion und Gewebsgehalt

PABA permeiert am Jejunum bei aerober Inkubation immer mit einer Bevorzugung der sekretorischen Richtung; die Permeationsraten sind nach blutseitigem Angebot in allen untersuchten Konzentrationen bei 7°C oder 37°C höher als nach lumenseitigem Substratangebot. Der Gewebsgehalt am Versuchsende ist bei blutseitigem Angebot immer höher als bei lumenseitigem Angebot. Die Permeationsasymmetrie der Säure wird damit durch den Gewebsgehalt unterstützt. Gleichen sich bei einer Angebotskonzentration von 50 mM die Gewebsgehalte einander an, so ist auch gleichzeitig eine Sättigung der blutseitig höheren Permeationsrate zu beobachten.

Für Ac-PABA kann am Meerschweinchen-Jejunum ebenfalls eine Netto-Sekretion nachgewiesen werden. Ac-PABA wird am Jejunum nicht weiter metabolisiert. Die Permeationsraten sind in beiden Richtungen, d.h. nach lumen- oder blutseitigem Angebot, geringer als die des PABA. Ac-PABA ist mit einem pK_a -Wert von 4,23 eine stärkere Säure als PABA mit pK_a -Wert von 4,93. Der geringere Anteil der freien Säure entspricht in etwa der Minderung der Flußraten. Konträr zu diesem Befund sind die Ergebnisse bei der Metabolisierung von PABA: hier weisen PABA und Ac-PABA gleiche Permeabilitäten im Abgabeschritt aus dem Enterocyten auf. Wie bei PABA kann auch für Ac-PABA am Versuchsende ein höherer Gewebsgehalt bei blutseitigem Angebot nachgewiesen werden; auch in diesem Fall unterstützt der Gewebsgehalt die Permeationsasymmetrie.

Nach theoretischen Überlegungen von Murer und Burckhardt (1983) hat bei dem Transport einer Säure die negative Ladung des Anions einen entscheidenden Einfluß auf die zelluläre Lokalisation des Transportsystems. Zwischen dem Zellinnenraum und dem Medium besteht eine Potentialdifferenz von rund -60 mV. Für ein monovalentes Anion errechnet sich aus dieser Potentialdifferenz ein Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärer Konzentration bei einem Gewebsgehalt von 10 % der Angebotskonzentration. Ein unter dieser Voraussetzung effektives Transportsystem könnte nun aus einem Einwärtstransport der Säure über diesen elektrochemischen Gleichgewichtspunkt hinaus und aus einem Auswärtstransport über Mechanismen der vermittelten Diffusion bestehen. Der Transport über den elektrochemischen Gleichgewichtspunkt kann dabei energetisiert -beispielsweise als natriumgekoppelter Transport- oder aber von einer Wasserstoffionen-Sekretion begünstigt sein. Je nach Lage des aktiven Transportschrittes in der apikalen oder basolateralen Membran könnte über das vorgeschlagene Transportsystem eine Netto-Resorption oder eine Netto-Sekretion vermittelt werden.

Untersuchungen zum Mechanismus der Netto-Resorption von Milchsäure im Ratten-Jejunum bestätigten dieses Modell. Die lumenseitige Aufnahme des Lactats wird über einen natriumgekoppelten Transport vermittelt (Hildmann und Mitarbeiter, 1979). Blutseitig erfolgt die Abgabe dieser Verbindung dagegen passiv über einen Mechanismus der facilitated diffusion (Storelli und Mitarbeiter, 1980).

Die Netto-Sekretion einer sauren Verbindung konnte am Präparat der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums mit der Sulfanilsäure beschrieben werden (Sund und Lauterbach, 1978). Ein besseres Substrat eines Sekretionsmechanismus stellt das lipophilere, azogekuppelte Derivat der Sulfanilsäure β -Naphtholorange dar (Lauterbach und Kilian, 1976, Lauterbach, 1983). Für die Abgabe dieser Verbindung in das Darmlumen konnte in vivo ein Transport gegen einen Konzentrationsgradienten von 1 : 13 nach einer intravenösen Gabe am Ratten-Jejunum beobachtet werden (Kilian und Lauterbach, 1978). Wollenberg und Mitarbeiter (1983) beschreiben die Sekretion

von β -Naphtholorange an einem vaskulär und lumenseitig perfundierten Präparat des Mäuse-Jejunums.

Die Netto-Sekretion einer Säure ist, wie auch die Befunde dieser Studie zeigen, nicht auf die Sulfonsäuren beschränkt. Salicylsäure (Lauterbach und Steinke, 1981, Lauterbach, 1983) weist an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums ähnliche Permeationsraten wie PABA auf. Ebenfalls in Richtung einer Netto-Sekretion permeiert am gleichen Präparat die Harnsäure (Sprakties, 1983), Chlorphenolrot (Lauterbach, 1975) und die Trimethoxybenzoesäure (Kolassa und Mitarbeiter, 1977). Allen bisher untersuchten Substraten, einschließlich PABA und Ac-PABA, ist gemeinsam, daß die Gewebsgehalte nach blutseitigem Angebot immer höher als nach lumenseitigem Angebot waren und daß damit diese Asymmetrie der Gewebsgehalte den Mechanismus einer Netto-Sekretion der Säure unterstützt. Legt man das Modell von Murer und Burckhardt zugrunde, so sollten danach für Säuren in der contraluminalen Membran Mechanismen vorliegen, die eine Aufnahme über den Gleichgewichtspunkt vermitteln.

6.2.2. Stoffwechselabhängigkeit der Netto-Sekretion

Besonders interessant war in der vorliegenden Studie das Verhältnis der Flußraten des PABA unter der inhibitorischen Versuchsbedingung einer anaeroben Inkubation. Anders als bei den Substraten Chlorphenolrot (Lauterbach, 1975), Trimethoxybenzoesäure (Kolassa und Mitarbeiter, 1977), Salicylsäure (Steinke, 1980), Sulfanilsäure (Sund und Lauterbach, 1978) und β -Naphtholorange (Lauterbach und Kilian, 1976, Lauterbach, 1979) kommt es beim PABA nicht zu einer Angleichung der Permeationsraten in beiden Richtungen. Parallel zur Reduktion der Flußrate nach blutseitigem Angebot verdoppelt sich die Permeationsrate nach lumenseitigem Angebot, so daß sich im Ergebnis eine Netto-Resorption ergibt. Die Einwirkung der Anaerobiose auf den Gewebsgehalt mit einer nur geringfügigen Steigerung nach blutseitigem und einer deutlichen Erhöhung nach lumenseitigem Angebot gleicht dagegen der von anderen Autoren

beobachteten Änderung der Gewebsgehalte anderer saurer Verbindungen unter Einfluß der Anaerobiose (Kolassa und Mitarbeitern, 1977, Steinke, 1980, Sund und Lauterbach, 1978).

Eine anaerobe Inkubation kann auf vielfältige Art und Weise in das Permeationsgeschehen eingreifen. Der intrazelluläre pH-Wert ist, wie Untersuchungen an isolierten Hepatocyten (Bonventre und Cheung, 1985) und anderen Zellsystemen (Übersicht bei Roos und Boron, 1981) ergeben haben, in einen sauren Bereich verschoben. Durch die fehlende Energetisierung der Na^+/K^+ -ATPase in der basolateralen Membran kommt es am Präparat der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums zu einer Verminderung des transepithelialen Potentials um 68 % (Schulze, unveröffentlichte Mitteilung). Parallel hierzu ist damit wahrscheinlich auch die intrazellulär negative Potentialdifferenz eingeschränkt.

6.2.3. Inkubationstemperatur und Netto-Transport

Ein weiterer überraschender Befund dieser Untersuchung findet sich in der geringen Einflußnahme einer Inkubationstemperatur von 7°C auf die Netto-Sekretion des PABA. Dabei bewirkt die Inkubation in der Kälte eine Verminderung der Permeationsraten des PABA, die jedoch für beide Flußraten ungefähr gleich und, darüberhinaus, ähnlich der des Markers PEG900 sind. Die Flux-Ratio als Verhältnis des sekretorischen zum resorptiven Fluß ändert sich dagegen nicht.

Einschränkend ist dabei jedoch anzumerken, daß der transzelluläre Anteil der Permeationsrate nach lumenseitigem Angebot bei 7°C vollständig unterdrückt wird und damit zwei Parameter in der Flux-ratio verglichen werden, die Ergebnis zweier unterschiedlicher Prozesse sind. Dabei ist die Permeationsrate nach blutseitigem Angebot die Summe aus trans- und parazellulärer Permeation, die Permeationsrate nach lumenseitigem Angebot ein reines Produkt der parazellulären Permeation. Trotz dieser Einschränkung bleibt der höhere Q_{10} -Wert des Einflusses der Kälte auf die Resorptionsquote, womit dieser Befund in einem Widerspruch zum Modell eines

energetisierten Netto-Transportes der Säure über Carrier-Mechanismen in der blutseitigen Membran gerät.

Ein vermittelter Transport ist jedoch nicht völlig ausgeschlossen. Lamers und Hülsmann (1975) konnten für Pyruvat einen sättigungsfähigen und kompetitiv inhibierbaren Transportmechanismus in Enterocyten des Ratten-Dünndarms bei einer Inkubationstemperatur von 0°C nachweisen. Dieser Mechanismus operiert jedoch unabhängig vom zellulären Metabolismus, der bei dieser Temperatur sehr stark eingeschränkt ist. Eine Permeation des PABA über Mechanismen der facilitated diffusion reicht jedoch nicht als Basis der Ungleichheit der Flußraten aus.

6.2.4. Änderungen im pH-Wert der Inkubate

Die Netto-Sekretion des PABA und des Ac-PABA wird von einer Alkalisierung der Lumenseite und einer Ansäuerung der Blutseite unterstützt. Das Verhältnis der Anteile der freien Säure in beiden Inkubationsmedien ist für PABA bei Inkubationsende mit 0,72 % freier Säure im lumenseitigem Inkubat und 0,91 % auf der Blutseite mit dem Faktor von 1,3 wesentlich kleiner als das Verhältnis der Flußraten. Aus den beobachteten Änderungen des pH-Wertes kann jedoch nicht auf den örtlich begrenzten pH-Wert im Bereich der Membranen geschlossen werden. Je nach Einschränkung der Diffusion saurer oder basischer Äquivalente durch den Mucus (Peppas und Mitarbeiter, 1984, Smith und Mitarbeiter, 1985) oder der unstirred water layer (Winne, 1977, Walter und Mitarbeiter, 1982, Barry und Diamond, 1984) könnten dabei diese nur geringfügigen Änderungen des pH-Wertes einen an der Membran sehr ausgeprägten pH-Gradienten reflektieren.

Eine Alkalisierung des Darmlumens konnte auch von Czekay (unveröffentlichte Mitteilung) bei einer in situ-Perfusion des Darmlumens festgestellt werden. Dabei stiegen die pH-Werte des lumen-seitigen Perfusates im Verlauf einer 45minütigen Perfusion im

Mittelwert von drei Versuchen von einem pH-Wert von 7,30 auf 7,89 kontinuierlich an.

Konträr zu dem Befund einer lumenseitigen Alkalisierung konnte bei in vitro Versuchen am Jejunum der Ratte ein saures und vom pH-Wert der Lösung weitgehend unabhängiges Mikroklima belegt werden (Blair und Mitarbeiter, 1974, 1975, Lucas, 1976, 1983, Kitis und Mitarbeiter, 1979, Lucas und Mitarbeiter, 1980, Högerle und Winne, 1983, Daniel und Mitarbeiter, 1985, Shiau und Mitarbeiter, 1985, Rechkemmer und Mitarbeiter, 1986). Neben dem Jejunum der Ratte konnte dieser Befund auch in vitro an humanem Biopsiematerial (Lucas und Mitarbeitern, 1978) wie auch von einem Autor in vitro am Meerschweinchen-Jejunum (Rechkemmer und Mitarbeitern, 1986) bestätigt werden. Für die Oberfläche des Ratten-Jejunums konnte im glukosefreien Medium ein pH-Wert zwischen 5,2 und 6,8 bei einem pH-Wert des Mediums von 7,3 - 7,4 bestimmt werden. Eine Inkubation mit Glukose im Inkubationsmedium führte zu einer weiteren Erniedrigung des pH-Wertes des Mikroklimas um 1,1 pH-Einheiten (Lucas und Mitarbeitern, 1980). Eine Erniedrigung der Natriumkonzentration führte in der gleichen Studie zu einer Reduktion des sauren Mikroklimas. Shiau und Mitarbeiter (1985) konnten dagegen keine Abhängigkeit des Mikroklimas von der Natriumkonzentration feststellen. Das morphologische Korrelat des Raumes des aciden Mikroklimas wurde in den Untersuchungen von Daniel und Mitarbeitern (1985) auf einen Raum in der Nähe der Villus-Spitzen mit einem pH-Wert von 6,65 eingeschränkt. Für den Raum in den Krypten, 260 - 300 μ m distal der Villus Spitze, konnte in der gleichen Studie ein alkalischer pH-Wert von 8,26 bestimmt werden.

Eine Kontroverse über den Einfluß des Mikroklimas auf die Permeation schwacher Säuren ergibt sich im Augenblick aus den Ergebnissen der in vivo Untersuchungen am Jejunum der Ratte. Konnte Lucas (1983) am Ratten-Jejunum den in vitro bestimmten pH-Wert von 6,3 - 6,5 in vivo mit einem pH-Wert von 6,1 bestätigen, fanden Rechkemmer und Mitarbeiter (1986) am Jejunum der Ratte in vitro einen pH-Wert von 6,8, dagegen in vivo einen pH-Wert von 7,2. Ein Abklemmen der enteralen Blutversorgung erzeugte im wandnahen Bereich einen

pH-Wert ähnlich dem in vitro bestimmten Wert. In der Diskussion seiner Resultate bestreitet Rechkemmer, sowohl bei der Ratte wie beim Meerschweinchen, die Existenz eines sauren Mikroklimas unter in situ-Bedingungen.

Der Einfluß eines aciden Mikroklimas auf den Transport acider Verbindungen wurde von verschiedenen Autoren beschrieben. So führen Naupert und Rommel (1975) die schon von Smyth und Taylor (1958) beobachtete Resorption der kurzkettigen Fettsäuren Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure gegen einen Konzentrationsgradienten auf die Existenz eines aciden Mikroklimas im Ratten-Jejunum zurück. Dabei ließen sich alle Befunde wie die Natrium-Abhängigkeit, die Sättigungsfähigkeit und eine metabolische Abhängigkeit des Transportes zwanglos mit dem Einfluß dieser Maßnahmen auf eine Na^+/H^+ -Carrierstruktur erklären. Kontrovers zu Rosenberg (1981) machen Blair und Mitarbeiter (1974, 1981) für die Resorption der Folsäure beim Menschen ein acides Mikroklima verantwortlich.

Das Modell eines sauren Mikroklimas bietet auch eine Erklärung der bei den Dünndarm-Präparaten der Humanmukosa beobachteten Netto-Resorption. Die höheren Gewebsgehalte bei lumenseitigem Substratangebot wie auch die höheren Permeationsraten deuten auf eine stärkere Aufnahme des Substrates in der apikalen Membran als Grundlage dieser Permeationsasymmetrie hin. Diese höhere Aufnahme könnte über den sauren pH-Wert im Bereich des Mikroklimas und einer damit verbundenen erhöhten Diffusion über Mechanismen der non-ionic diffusion vermittelt sein.

Ein saures Mikroklima im Jejunum der Ratte könnte auch eine Erklärung für die von Yasuhara und Mitarbeitern (1979a) beobachtete Netto-Resorption von PABA am everted/uneverted sac Präparat bieten. Ebenso könnte es die Anreicherung von PABA am Ratten-Jejunum in der serosal abtropfenden Lösung einer Fischer-Parsons Präparation um den Faktor 1,7 bei Gardner und Mitchell (1981) erklären. Die von Spencer und Mitarbeitern (1966) am everted sac und die von Arvanitakis und Mitarbeitern (1978) in vivo beobachtete Resorption

von PABA im Ratten-Jejunum wurde von diesen Autoren als passiver Transport gedeutet. Bei einer Interpretation dieses Befundes ist jedoch in Rechnung zu stellen, daß dabei PABA immer nur lumenseitig angeboten wurde und damit kein Vergleich der Permeationsraten zwischen beiden Angebotsseiten stattfindet. Untersuchungen zur Permeation von PABA am Meerschweinchen-Jejunum liegen in der Literatur nicht vor.

Der lumenseitige pH-Wert der Meerschweinchen-Mukosa ist gegenüber dem Ratten-Dünndarm wenig untersucht. Neben dem in vitro Befund von Rechkemmer und Mitarbeitern (1986) konnte in einer Studie von Lucas (1983) ein gegenüber der Inkubationslösung mit einem pH-Wert von 7,05 alkalischer pH-Wert von 7,22 im Mikroklima bestimmt werden. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit in vivo-Untersuchungen von Rechkemmer und Mitarbeitern (1986), die gegenüber dem pH-Wert der Lösung von 7,27 einen basischeren pH-Wert von 7,37 an der Oberfläche des Gewebes bestimmen konnten. Im Gegensatz zu den Untersuchungen an der Ratte deuten somit alle Studien, mit Ausnahme des in vitro-Befundes von Rechkemmer, auf die Existenz eines lokal begrenzten basischen Raumes an der apikalen Oberfläche des Meerschweinchen-Jejunums hin.

6.2.5. Ionencarrier als Ursache des lokalen Mikroklima

Über mögliche Mechanismen zur Erzeugung und Erhaltung eines Mikroklimas ist wenig bekannt. Von Lucas und Mitarbeitern (1980) wurde am Ratten-Jejunum ein Na^+/H^+ -Carrier diskutiert, über den die benötigten Wasserstoff-Äquivalente ausgeschieden werden. Von Shiao und Mitarbeitern (1985) wurden im Gegensatz hierzu am gleichen Präparat saure Mucopolysaccharide für die Existenz des Mikroklimas verantwortlich gemacht.

Für die lumenseitige Membran des Dünndarms sind in der Vergangenheit eine Vielzahl von Transportsystemen für Ionen beschrieben worden. So wurde von Parsons (1956) am Jejunum der Ratte parallel zu einer Ansäuerung des lumenseitigen Mediums eine Resorption von

Bicarbonat beobachtet. Konnten Feldman und Mitarbeiter (1984) diesen Transportmechanismus bei der Ratte bestätigen, fanden Vogel und Mitarbeiter (1970) am Jejunum des Meerschweinchens einen Bicarbonat sezernierenden Mechanismus. Parallel zu den Ergebnissen von Lucas fanden Murer und Mitarbeiter Hinweise auf einen Na^+/H^+ -Carrier (1976) in der apikalen Membran des Ratten-Jejunums. In geringerer Größenordnung fanden Cassano und Mitarbeiter (1984) am gleichen Präparat einen Cl^-/OH^- -Austausch. Gunther und Wright (1983) konnten am Jejunum des Kaninchens einen Na^+/H^+ -Antiport, jedoch keinen Hinweis auf einen Cl^-/OH^- -Austausch finden. Am Ileum des Kaninchens wurden als NaCl -resorbierende Mechanismen ein $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ - und ein Na^+/H^+ -Carrier in der luminalen Membran beschrieben (Smith und Mitarbeiter, 1985, Knickelbein und Mitarbeiter, 1983, 1985). Dieses Modell eines elektroneutralen Einwärts-transportes von Na^+ und Cl^- geht auf Untersuchungen von Turnberg und Mitarbeitern (1970) zurück, die in in vivo-Studien am Ileum des Menschen Hinweise auf die parallele Existenz beider Transportmechanismen fanden. In einer neueren Studie beschreiben Binder und Murer (1986) am Ileum der Ratte die Existenz eines unabhängig vom Na^+/H^+ -Carrier operierenden K^+/H^+ -Austauschers.

Bezogen auf die in dieser Studie beobachteten Phänomene ergeben sich aus der Literatur folgende Schlußfolgerungen:

1. Am Jejunum werden in der luminalen Membran eine große Anzahl an Ionencarriern beschrieben, welche sowohl eine Ansäuerung wie Alkalisierung vermitteln könnten.
2. Fast alle beschriebenen Mechanismen zur luminalen Ansäuerung beziehen sich auf Untersuchungen am Jejunum des Menschen oder der Ratte.
3. Für das Meerschweinchen-Jejunum ist ausschließlich ein Mechanismus der Bikarbonat-Abgabe beschrieben, welcher eine Alkalisierung der Lumenseite begünstigen würde.
4. In vivo konnte beim Meerschweinchen kein saures, sondern ein zur Inkubationslösung alkalisches Mikroklima an der lumenseitigen Oberfläche des Gewebes bestimmt werden.

5. Die Differenz in der Wasserbilanz zwischen Meerschweinchen (Enterosorption) und Ratte (Resorption, Vogel und Mitarbeiter, 1970) weist auf grundlegende Unterschiede zwischen beiden Spezies hin.

Eine Inhibition des nach Untersuchungen von Vogel und Mitarbeitern (1970) aktiven Transportes von Bikarbonat könnte auch die in der Anaerobiose bei lumenseitigem Angebot erhöhten Gewebsgehalte organischer Säuren und die für PABA gesteigerte Durchtrittsrates erklären. Darüberhinaus kommt es jedoch in der anaeroben Versuchsbedingung zu einer vermehrten Bildung von Milchsäure aus dem anaeroben Stoffwechsel (Kilian, unveröffentlichte Mitteilung). Die dabei entstehenden sauren Äquivalente verteilen sich, wie sich aus den pH-Werten der Inkubate ergibt, in gleichen Anteilen in die lumen- und blutseitige Lösung.

6.2.6 Vermittelter Transport von PABA

Verschiedene Hinweise deuten auf einen vermittelten Transport von PABA über die luminale und die contraluminal Membran hin. So kommt es bei blutseitigem Angebot und einer lumenseitigen hyperosmolaren Schädigung zu einer von der Osmolarität (und damit dem Ausmaß der Schädigung) abhängigen Hemmung der Abgabe von Tracer zur Lumenseite und zu einer Akkumulation im Gewebe. Da unter der gleichen Noxe auch der lumenseitige, nicht jedoch der blutseitige Metabolisierungsraum geschädigt ist, wird damit der sekretorische Fluß des PABA über den lumenseitigen Metabolisierungsraum vermittelt. Bei lumenseitigem Angebot ist der verminderte Gewebsgehalt im Bereich der ansteigenden Osmolarität der Vorinkubation noch in guter Übereinstimmung mit dem Modell eines geschädigten Carrier-Mechanismus. Nicht erklärbar bleibt jedoch die im Bereich höherer Osmolarität unabhängig von der shunt-Permeabilität ansteigende Resorptionsquote.

Eine Erklärung dieser Beobachtung könnte in zwei verschiedenen, die Permeabilität des PABA beeinflussenden, Mechanismen liegen:

(1) der vermittelte Transport und (2) die von Vogel und Mitarbeitern (1970) nachgewiesene, aktive Sekretion von Bikarbonat in das Darmlumen. Während bei der Schädigung des Transporters für PABA die Permeabilität der apikalen Membran sinkt, führt eine Inhibition des Bikarbonat-Transports zu einer verminderten Alkalisierung und, infolgedessen, zu einer erhöhten Permeabilität bei lumenseitigem Angebot.

Im Gegensatz zum carriervermittelten Transport über die apikale Membran des lumenseitigen Metabolisierungsraumes liegt kein direkter Befund zum Permeationsmechanismus in der contraluminalen Membran des blutseitigen Kompartimentes vor. Hier erschließt sich der vermittelte Transport von PABA und seinem Metaboliten nur aus einem Vergleich der in die Angebotsmedien zurücksezernierten Quantitäten an Ac-PABA im Metabolisierungsversuch. Aus der dabei in etwa gleichen Menge des zur Angebotsseite zurücksezerniertem Ac-PABA ergeben sich ähnliche Permeabilitäten für PABA in der luminalen Membran des lumenseitigen und contraluminalen Membran des blutseitigen Metabolisierungsraumes. Die passiven Permeabilitäten der luminalen und contraluminalen Membran liegen für die Substrate Thioharnstoff, Phenobarbital und Cortisol nach Lauterbach (1977) in einem vergleichbaren Wertebereich. Es erscheint nun unwahrscheinlich, daß gerade für PABA die passive Permeabilität der basolateralen Membran um soviel größer als die der Lumenseite sein soll, als nötig wäre, den Einfluß des luminalen Transportsystems zu kompensieren.

6.2.7. pH-Wert des Mediums und Transportrate

Der Netto-Transport von PABA am Meerschweinchen-Jejunum könnte einerseits über Transportmechanismen in der luminalen- und in der basolateralen Membran erfolgen, wird jedoch andererseits über Mechanismen der Alkalisierung der Lumenseite und die Ansäuerung des blutseitigen Inkubates unterstützt. Auffallend ist auch, daß die Netto-Transportrate am Dünndarm immer in einer Übereinstimmung zu den pH-Werten steht: So findet sich im Gegensatz zum Meerschwein-

chen nach Lucas und Mitarbeitern (1978) am humanen Präparat ein saures Mikroklima und PABA wird in unseren Versuchen netto-resorbiert. Beim Meerschweinchen kommt es unter Einfluß einer anaeroben Inkubation zu keiner Alkalisierung der Lumenseite; gleichzeitig kehrt sich die Sekretion zu einer -wenn auch im Verhältnis der Flüsse schwächer ausgeprägten- Netto-Resorption um.

Bei der Untersuchung von Transfermechanismen am Mukosaepithel wird in der Regel zwischen Transportmechanismen in der luminalen und in der contraluminalen Membran differenziert. Mit der Kompartimentierung des Metabolismus sind jedoch im Falle des PABA vier Membransysteme beteiligt: die luminalen- und die contraluminalen Membranen des lumen- wie auch des blutseitigen Kompartiments. Wenn dabei auch der Transport von PABA über die contraluminalen Membran des blutseitigen Metabolisierungsraumes wahrscheinlich über einen Carrier vermittelt wird, so sagt dies jedoch nichts über den Transfermechanismus des PABA in der contraluminalen Membran des lumen-seitigen Raumes aus. Gerade dieser Transfermechanismus vermittelt jedoch die höheren Gewebsgehalte bei blutseitigem Angebot und damit wahrscheinlich auch den Netto-Transport. Um den Einfluß des pH-Wertes auf diesen Aufnahmeschritt zu untersuchen, wurden Versuche mit unterschiedlichen pH-werten des Mediums durchgeführt.

Eine annähernd lineare Abhängigkeit zwischen dem pH-Wert des Inkubationsmediums und dem Gewebsgehalt oder der Sekretionsrate bei blutseitigem Angebot findet sich nur bei einer Inkubationstemperatur von 7°C. Die Beziehung zwischen dem pH-Wert, also dem Grad der Ionisation im Medium, dem Gewebsgehalt und der Permeationsrate ist bei einer Inkubationstemperatur von 37°C wesentlich komplexer. Sowohl in der aeroben wie in der anaeroben Inkubation zeigt die Permeation von PABA im mehr basischen Bereich eine deutliche Abhängigkeit vom pH-Wert, bleibt jedoch bei einer mehr sauren Inkubation im gleichen Bereich wie bei dem neutralen Wert. Am Ratten-Jejunum konnte von Said und Strum (1983) und Selhub (1984) für die Resorption von Methyltetrahydrofolat und von Russel und Mitarbeitern (1979) für die Resorption der Folsäure eine maximale Transportleistung des Systems im Bereich von pH 6-6,3 beschrieben wer-

den. Ein ähnliches pH-Optimum läßt sich -zumindest im untersuchten Wertebereich- für den Transport von PABA nicht nachweisen.

In einer vereinfachten Modellvorstellung der Permeation von PABA ohne Berücksichtigung der lokaleren pH-Werte im Bereich der Membranen spricht die fehlende Einflußnahme des pH-Wertes auf die Permeation bei der mehr sauren Inkubation eindeutig gegen Mechanismen der non-ionic diffusion und für einen im größten Anteil vermittelten Transport. Gleiches gilt jedoch nicht für ein Modell mit einem lokalen Mikroklima; hier steht der pH-Wert in diesem Raum in einem komplexen Verhältnis zum pH-Wert und der Pufferkapazität der Inkubationslösung, der Pufferkapazität und der Permeabilität des lokalen Raumes wie der ausgeschiedenen Menge an sauren oder basischen Einheiten. Abbildung 26 macht diese Abhängigkeit an einem Arbeitsmodell von Winne (1977) deutlich; die Abhängigkeit des lokalen pH-Wertes vom pH-Wert des Mediums reicht dabei, je nach Wahl der Parameter, von gleichen pH-Werten in beiden Räumen (Abb.26, Verhältnis der Sekretion saurer Äquivalente zum Permeabilitätskoeffizienten des Mikroklimas $F_{TD}/P = 0.01$) bis zu einem völlig unabhängigen pH-Wert im Mikroklima (Abb. 26, $F_{TD}/P=1$). Interessanterweise wird dieses, in sich schon sehr komplexe, Modellbild von Winne (1977) in einem Zusatz zu der theoretischen Ausarbeitung aufgrund neuerer Erkenntnisse als zu vereinfachend verworfen.

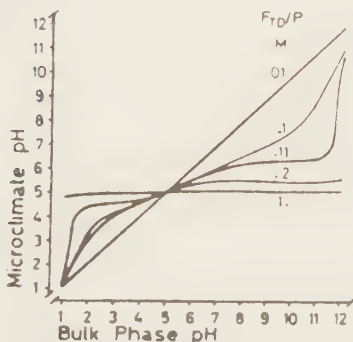


Abb.26 :
pH-Wert eines lumenseitig aciden Mikroklimas in Abhängigkeit von pH-Wert des Inkubationsmediums (aus Winne,1977)

6.3. Transport von Carbonsäuren und β -Naphtholorange

Bei der Untersuchung der Permeation von Salicylsäure und β -Naphtholorange ergeben sich nach Lauterbach (1983) Hinweise, die auf die Existenz verschiedener Transportmechanismen für beide Verbindungen deuten. Eingesetzt wurde in diesen Versuchen das alkylierende Agens Phenoxybenzamin (PBA), wobei der Transport des β -Naphtholorange, nicht jedoch die Netto-Sekretion der Salicylsäure gehemmt werden konnte. Eine Inhibition der Netto-Sekretion des β -Naphtholorange über blutseitig gegebenes PBA konnte auch im Rahmen dieser Studie belegt werden. PABA verhielt sich, im Gegensatz hierzu, entsprechend der Salicylsäure; eine Hemmung der Netto-Transportleistung konnte nicht beobachtet werden. Damit erhält die von Lauterbach (1983) formulierte Hypothese verschiedener Transportsysteme anionischer Verbindungen am Jejunum eine weitere Bestätigung. PABA und Ac-PABA ordnen sich dabei in der Gruppe der Carbonsäuren dem Permeationsmechanismus der Salicylsäure zu, während β -Naphtholorange wahrscheinlich über einen eigenständigen, unabhängigen Mechanismus transportiert wird.

7. Ergebnisteil der Untersuchungen zum Permeationsmechanismus aromatischer Säuren am Colon

7.1 Feuchtgewicht, ER und shunt-Permeabilität

Wie schon bei den Versuchsbedingungen am Jejunum, stellen auch am Colon die mit Krebs-Tris-Glukose-Mannit bei 37°C und Sauerstoff-begasung durchgeführten Versuche die mit Abstand größte Versuchsgruppe dar. Das mittlere Tiergewicht beträgt 468,8 +/- 5,0 g, N=396 (errechnet auf Basis der einzelnen Versuchskammern). Dabei fallen 84 % der Kammern auf die proximalen sechs und 16 % auf die distal gelegenen sechs der insgesamt maximal zwölf präparierten Darmstücke. Das mittlere Feuchtgewicht der untersuchten Mukosae beträgt 5,52 +/- 0,08 mg, N=396. Wie an den Mukosae des Jejunums besteht zwischen Tiergewicht und Feuchtgewicht oder Darmstück und Feuchtgewicht keinerlei Abhängigkeit.

Sowohl der extrazelluläre Raum nach lumenseitigem Angebot mit 1,495 +/- 0,074 μ l, N=186, wie sein blutseitiges Äquivalent mit 1,618 +/- 0,037 μ l, N=182, sind mit einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0.00001$ mit dem Feuchtgewicht korreliert. Dabei steigt der ER mit dem Feuchtgewicht auf beiden Seiten des Gewebes. Zwischen dem Tiergewicht und dem ER oder dem Darmstück und dem ER besteht kein Zusammenhang. Für die Lumenseite kann ein extrazellulärer Raum in Prozent des Feuchtgewichtes von 25,90 +/- 0,85 %, N=193 und für die Blutseite ein ER% von 29,17 +/- 0,56 %, N=192, errechnet werden.

Ordnet man die Einzelwerte der extrazellulären Räume in Klassen von 2 % und trägt ihre Anzahl in den Klassen graphisch auf, erhält man die Verteilungsfunktion der Meßwerte. Verteilt sich dabei der blutseitige ER relativ gleichmäßig gemäß einer Gauß-Funktion, so scheint für den lumenseitigen ER eine doppelgipfelige Verteilung möglich (Abb.27). Diese Verteilung steht in Übereinstimmung mit dem empirischen Befund, daß im einzelnen Experiment der lumenseitige Extrazellulärraum in Abhängigkeit vom Versuchstier entweder im Mittel um einen zu niedrigen oder zu hohen Wert

streute. In einem statistischen Test auf Normalverteilung (Chi-Quadrat-Test, Sachs, 1974) kann für den lumenseitigen ER mit $p < 0,001$ keine statistisch absicherbare Differenz zu einer Gauß-Verteilung nachgewiesen werden.

Unter beidseitigem Einsatz von PEG900 wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten unter anderem auch die Extrazellulärräume und das Feuchtgewicht der Mukosae bestimmt (Tab.31). Der hier ermittelte Gesamt-ER ist, in Anbetracht der weiten Streuung der für den ER bestimmten Werte (Abb.27) in guter Übereinstimmung mit der Summe der Mittelwerte des ER nach einseitigem Markerangebot. Dar-

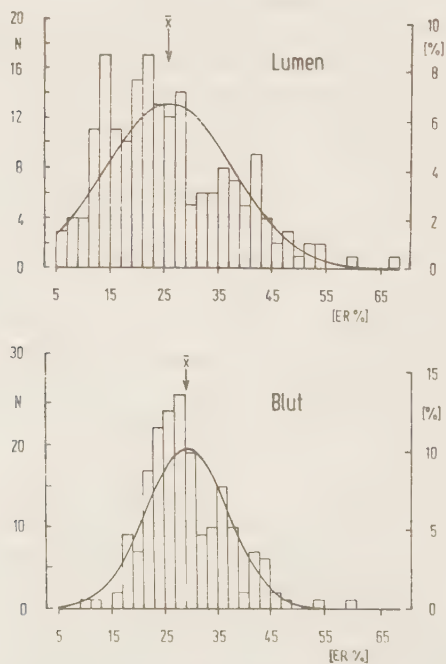


Abb.27: Häufigkeitsverteilung der Extrazellulärräume nach lumen- (oben) oder blutseitigem (unten) Angebot von PEG900 in Prozent des Feuchtgewichtes in Klassen von 2 %, linke Einteilung: Anzahl Meßwerte je Klasse, rechte Einteilung: Häufigkeit in Prozent bezogen auf alle Werte, die eingezeichnete Funktion entspricht der theoretischen Gauß-Verteilung

überhinaus wurde in einem Versuch dieser Serie PEG in einigen Versuchskammern beidseitig, in anderen Versuchskammern mit Mukosae des gleichen Versuchstieres lumen- oder blutseitig eingesetzt. Dabei ist die Summe beider Extrazellulärräume (ER % Lumen 21,46 +/- 3,83 %, N=3, ER % Blut 24,01 +/- 1,37 %, N=5) mit 45,47 % nicht größer als der unter beidseitigem Angebot bestimmte ER mit 51,59 +/- 2,38 %, N=3. Diese Übereinstimmungen belegen, daß beide Extrazellulärräume voneinander unabhängig sind und der Gesamt-ER in den einzelnen Versuchsserien aus der Summe beider Extrazellulärräume bestimmt werden kann. Legt man alle Versuchskammern mit einseitigem Markerangebot zugrunde, ergibt sich ein Gesamt-ER von 55,07 % des Feuchtgewichtes.

Tab.31: Feuchtgewicht (FG) und Extrazellulärraum (ER) des Meerschweinchen-Colons bei beidseitigem Markerangebot, Inkubationsmedium: Krebs-Tris-Glukose-Mannit, pH 7,00, 37°C, Sauerstoffbegasung

Inkubationszeit min		20	45	90	180
FG mg		5,59	6,50	6,16	6,35
	S.E.M	0,28	0,36	0,33	0,42
	N	8	14	15	12
ER µl		2,730	3,193	3,531	3,408
	S.E.M.	0,184	0,209	0,320	0,409
	N	8	14	15	12
ER %		48,78	49,71	56,03	53,78
	S.E.M.	2,25	2,38	2,39	4,58
	N	8	14	15	12

Die extrazelluläre Permeation der Markersubstanz PEG900 zeigt am Colon keine von der Angebotsseite abhängige Permeationsasymmetrie. Der PEG-Fluß ist nach lumenseitigem Angebot mit 0,534 +/- 0,018 %, N=156 und nach blutseitigem Angebot mit 0,544 +/- 0,016 %, N=157, etwas höher als die vergleichbaren Flüsse am Jejunum. Zwischen Darmstück und Permeabilität läßt sich keine, zwischen Tiergewicht und Permeabilität nur eine schwache Abhängigkeit in der Korrelationsanalyse erkennen. Dabei sind die Mukosae kleinerer Tiere etwas dichter im Sinne einer verringerten shunt-Permeabilität. Diese Beziehung zeigt sich nach lumenseitigem Angebot ausgeprägter als nach blutseitiger Markerzugabe; so lassen sich aus der Korre-

lationsrechnung hypothetische Permeationsraten eines Tieres von 310 g von 0,412 % und eines Tieres von 600 g von 0,615 % nach lumenseitigem und, bei gleichen Tiergewichten, 0,497 % und 0,584 % nach blutseitigem Angebot errechnen.

7.2. Untersuchungen zum Permeationsmechanismus von PABA

7.2.1 Konzentrationsabhängigkeit

Die Permeationsraten von einseitig gegebenem PABA sind an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Colons in resorptiver Richtung bis zu einem Faktor von 14,5 größer als die Permeationsraten in sekretorischer Richtung (Abb.28,Tab.32). Eine Sättigung der resorptiven Flüsse kann ab einer Angebotskonzentration von 20 mM beobachtet werden. Die Flußrate nach blutseitigem Angebot erhöht sich schwach signifikant bei einer Konzentration von 50 mM. Diese Steigerung ist von einem Anstieg der über die Markersubstanz

Tab.32 : Konzentrationsabhängigkeit des Gewebsgehaltes und der Permeationsraten von lumen- oder blutseitig gegebenen PABA am Meerschweinchen-Colon nach 45 min Inkubation, Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer, pH=7,00, O₂, 37°C, (*-***). Stat.Vergleich Angebotsseite Lumen gegen Blut, (o-ooo) gegen nächst niedere Konzentration gleicher Angebotsseite

Konzentration (mM)	0,01	0,10	2,00	20,00	50,00
Angebotsseite Lumen:					
Gewebsgehalt (%)	57,89***	126,21**	80,84 ^{ns}	39,32 ^{ns}	33,66 ^{ns}
S.E.M.	5,07	11,87 ^{ooo}	13,90 ^o	5,84 ^o	5,06 ^{ns}
N	64	9	16	12	9
Permeation (%)	23,02***	27,04***	23,78***	8,861***	6,164***
S.E.M.	1,45	2,52 ^{ns}	2,48 ^{ns}	0,395 ^{ooo}	0,329 ^{ooo}
N	57	11	15	10	8
Angebotsseite Blut:					
Gewebsgehalt (%)	136,82	79,70 ^{ooo}	60,65 ^o	49,28 ^{ns}	71,36 ^{ns}
S.E.M.	6,54	4,57	4,11	3,75	20,56
N	58	9	18	12	7
Permeation (%)	1,764	1,837 ^{ns}	1,652 ^{ns}	1,345 ^{ns}	2,710 ^o
S.E.M.	0,097	0,179	0,239	0,239	0,228
N	50	10	15	10	3

PEG900 bestimmten shunt-Permeabilität begleitet. Bei einer überschlägigen Rechnung vermag jedoch die um ca. 50 % gestiegene Markerpermeation die zwischen 20 und 50 mM PABA verdoppelte Substratpermeation alleine nicht zu erklären.

Wie nach blutseitigem Angebot, ist die Permeationsrate des Markers bei einer Angebotskonzentration des Substrates von 50 mM auch nach lumenseitigem Angebot deutlich erhöht. Alle anderen Parameter wie Feuchtgewicht oder der extrazelluläre Raum der Mukosae werden dagegen nicht von der Angebotskonzentration des Substrates beeinflusst. Der Gewebsgehalt am Versuchsende zeigt eine ausgeprägte Abhängigkeit von der Angebotskonzentration. Dabei übersteigt bei 10 μ M der Gewebespiegel nach blutseitiger Gabe hochsignifikant die

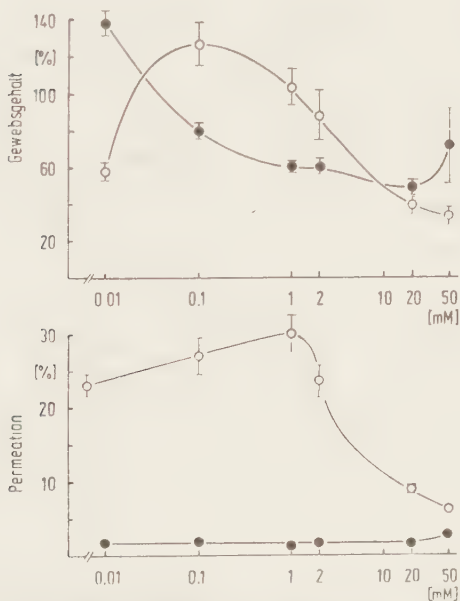


Abb. 28: Konzentrationsabhängigkeit von Gewebsgehalt (oben) und Permeationsraten (unten) von 0,01 bis 50 mM PABA nach lumen- (offene Symbole) oder blutseitigem (geschlossene Symbole) Angebot. Anzahl der Versuche pro aufgetragenem Wert s.Tab.32

intrazelluläre Konzentration bei lumenseitigem Angebot. Eine Steigerung der Angebotskonzentration auf 100 μM bewirkt eine Umkehrung dieses Verhältnisses mit einem nun signifikant höheren Gewebsgehalt bei lumenseitigem Angebot.

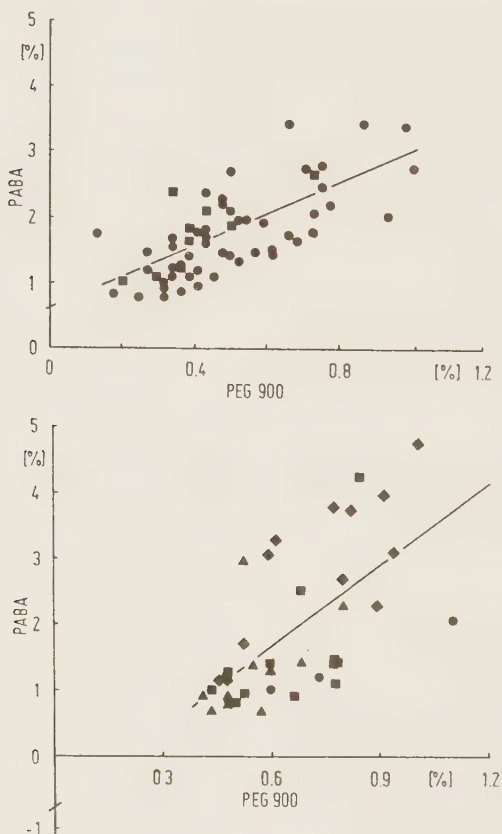


Abb.29 :Korrelation der Permeation zwischen PEG900 (Abszisse) und 0,01 (●) 0,1mM (■) PABA (Ordinate, obere Bildhälfte) oder 1 (●), 2 (■), 20 (▲) und 50mM (◆) PABA (untere Bildhälfte) nach blutseitigem Angebot am Meerschweinchen-Colon. Regressionsgeraden s.Tab.33

Tab.33:Regressionsanalyse der PEG- und PABA-Permeation am Meer-
schweinchen-Colon nach blutseitigem Angebot von 0,01 bis
50 mM PABA, Regressionsgerade $y=A+Bx$ ($A= PABA_{I,R}$); Re-
gressionskoeffizient r ; Wahrscheinlichkeit A ungleich 0;
extrazellulärer Anteil der Permeation, $PABA_{E,R}$

Konzentration (mM)	A	B	r	A±0 (%)	PABA _{E,R} (%)	N
0,01	0,538	2,43	0,719	99,5	1,224	50
0,10	0,655	2,78	0,756	86,5	1,114	9
0,10-0,01	0,608	2,37	0,709	99,9	1,157	59
1,00	-0,138	1,97	0,979	57,8	1,150	4
2,00	-0,669	3,45	0,531	45,2	2,181	13
20,00	-0,306	3,02	0,478	21,3	1,649	10
50,00	-0,363	4,47	0,767	30,8	3,261	12
1,0-50,0	-0,783	4,08	0,643	84,4	1,193	39

Zur Untersuchung des extra- und transzellulären Anteils der Permeation wurden die Permeationsraten nach blutseitigem Angebot einer Korrelationsanalyse unterzogen (Abb.29,Tab.33). Der bei einem PEG-Fluß von Null Prozent verbleibende Substratfluß kann als transzelluläre Substratpermeation interpretiert werden. Danach erfolgt der überwiegende Anteil der Permeation des PABA in sekretorischer Richtung extrazellulär. Ein positiver Abszissenabschnitt läßt sich nur bei einer Konzentration von 10 µM PABA statistisch sicher belegen. Die Steigerung der Angebotskonzentration über 2 mM bewirkt eine Verschiebung des Schnittpunktes in den negativen Bereich; dieser negative Abszissenabschnitt kann jedoch in keiner Konzentration statistisch abgesichert werden. Für die Permeation des PABA in resorptiver Richtung läßt sich keine Korrelation zur PEG-Permeation bestimmen.

7.2.2. pH-Wert Änderungen der Inkubationsmedien während der Inkubation

Die Kontrolle der pH-Werte nach Inkubationsende ergab eine starke Verschiebung der pH-Werte der Inkubationsmedien. Dabei kam es auf der Lumenseite zu einer Ansäuerung des Inkubationsmediums, wohingegen der blutseitige Raum leicht alkalisiert wurde (Tab.34). Die Inkubation mit 10 μ M PABA im Inkubationsmedium hatte in Kontrollversuchen keinen Einfluß auf die Ansäuerung bzw. Alkalisierung. Die Änderungen der pH-Werte konnten statistisch nicht direkt verglichen werden, da sie sowohl von dem pH-Wert des Mediums wie auch seiner Puffer-Kapazität bestimmt werden. Aus diesem Grund wurden nach Titration des Puffers (Abb.1) die pro Mukosa abgegebenen Säureäquivalente berechnet (Tab.34). Analog zu dieser Methode wurde die Alkalisierung als negative Wasserstoff-Ionen Bilanz angegeben (Tab.34). Aus dem Mittel der abgegebenen sauren Äquivalente läßt sich für die Mukosa des Meerschweinchen-Colons eine Wasserstoffionen-Sekretion in den lumenseitigen Raum von 54,8 $\pm$ 1,39 nmol pro cm^2 und min, N=88, errechnen. Parallel hierzu

Tab 34: pH-Wert-Änderungen des Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffers unter Einfluß von 0,01 und 50 mM PABA, pH₀: pH-Wert am Versuchsanfang
pH₄₅: pH-Wert am Versuchsende nach 45 min Inkubation; Stat.Vergleich: gegen 0,01mM PABA für jeweils gleiche Inkubationslösungen

PABA	0,01 mM		50,0 mM		50,0 mM	
	Lumen	Blut	lumenseitig		blutseitig	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pH ₀	7,011	7,016	6,980	7,040	7,040	6,980
pH ₄₅	6,531	7,156	6,959	6,910	6,710	7,053
S.E.M.	0,018	0,005	0,005	0,007	0,027	0,020
H ⁺ -Äquivalente (nmol)						
S.E.M.	+492,9 12,5	-222,8 10,8	+ 30,7*** 7,6	+188,0*** 9,2	+416,9 ^{ns} 29,6	-114,7* 31,4
N	88	88	9	9	7	7
Δ H ⁺ (nmol)	+207,1		+218,7		+228,9	

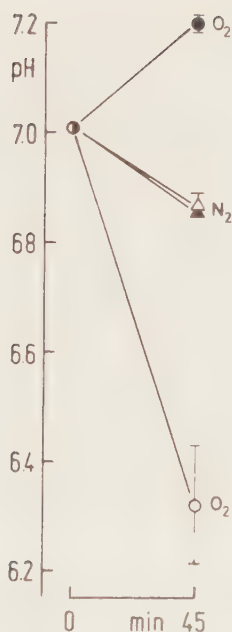


Abb.30:
Änderungen der lumenseitigen (offene Symbole) und blutseitigen (geschlossene Symbole) pH-Werte unter Einfluß einer aeroben (O₂) oder anaeroben (N₂) Inkubation, jeder Wert repräsentiert sechs Versuche; Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer ohne Substrat

Tab.35: Einfluß der Anaerobiose auf pH-Wert Änderungen eines Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffers nach 45 min Inkubation gepaarter Mukosae; Statistischer Vergleich zwischen jeweils gleichen Seiten

	Sauerstoff		Stickstoff	
	Lumen	Blut	Lumen	Blut
pH ₀	7,009	7,009	7,009	7,009
pH ₄₅	6,321	7,202	6,866	6,853
S.E.M.	0,110	0,014	0,027	0,006
H ⁺ -Äquivalente (nmol)	+610,1	-332,3	+180,6***	+214,0***
S.E.M.	50,9	28,8	40,1	9,3
N	6	6	6	6
ΔH ⁺ (nmol)	+277,8		+394,6	
Kilian (unveröff.Mittlg.):				
Milchsäure (nmol)	22,1	105,6	32,6	257,5
S.E.M.	6,7	17,4	4,2	34,1
N	8	8	7	7

kommt es zu einer Alkalisierung des blutseitigen Raumes entsprechend einer Abgabe von $24,8 \pm 1,20$ nmol pro cm^2 und min, $N=88$, basischer Äquivalente. Die gegenüber den basischen Einheiten stärkere Sekretion saurer Äquivalente konnte über den Mittelwert hinaus auch in allen Einzelversuchen beobachtet werden.

Nach einer Inkubation mit 50 mM PABA kommt es, vor allem nach lumenseitigem Angebot, zu einer erheblichen Reduktion der Ansäuerung des Mediums (Tab.34). Dabei ist nach lumenseitigem Angebot die Ansäuerung des lumenseitigen Inkubates annähernd vollständig unterdrückt und der blutseitige pH-Wert in den sauren Bereich verschoben. Bei einer Inkubation von 50 mM PABA im blutseitigen Medium ist die Ansäuerung und die Alkalisierung nur schwach gehemmt (Tab.34). Statistisch läßt sich diese Hemmung nur bei der Alkalisierung des blutseitigen Mediums als schwach signifikant belegen.

In den Versuchen zum Einfluß der Anaerobiose auf den Mechanismus der Ansäuerung wurde in der Inkubation kein PABA mitgeführt. Der Einfluß einer anaeroben Inkubation mit Stickstoff unterdrückt den polaren Mechanismus einer lumenseitigen Ansäuerung und blutseitigen Alkalisierung vollständig (Abb.30, Tab.35); beide Räume werden angesäuert. Verglichen mit den unter Sauerstoff erhaltenen Werten ist die zur Lumenseite abgegebene Menge an Wasserstoff-Äquivalenten unter Anaerobiose auf ein Drittel reduziert. Interessant erscheint auch ein Vergleich mit den von Kilian (unveröffentlichte Mitteilung) in einer anderen Versuchsserie am Meerschweinchen-Colon untersuchten Abgabe an Milchsäure aus der Mukosa in die Inkubationslösungen (Tab.35). Die dabei unter Anaerobiose zur Blutseite abgegebene Menge an Lactat entspricht in etwa der insgesamt unter Anaerobiose ausgeschiedenen Menge an sauren Äquivalenten.

7.2.3 Verteilung von PABA nach beidseitigem Angebot

Aufgrund der hohen Permeationsraten des PABA nach lumenseitigem Angebot erschien es sinnvoll, die Verteilung der Säure bei beidseitigem Substratangebot zu untersuchen. PABA wurde bevorzugt in einer Konzentration von 2 mM eingesetzt, wobei die Metabolisierung des Substrates zu Ac-PABA in diesem Konzentrationsbereich schon weitgehend abgesättigt ist. Andererseits zeigt der Permeationsmechanismus nach lumenseitigem Angebot keine Sättigung. Parallel zur Verteilung des Substrates wurden auch die Änderungen des pH-Wertes der Inkubationsmedien untersucht.

Im Verlauf der Inkubation verteilte sich PABA kontinuierlich von der Lumen- zur Blutseite (Abb.31,Tab.36). Diese Substratbewegung erfolgte zu jedem Zeitpunkt der Inkubation gegen einen Konzen-

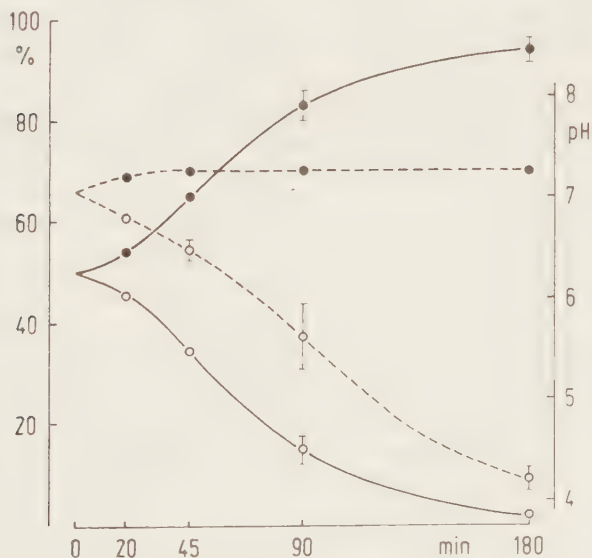


Abb. 31: Verteilung von 2 mM PABA nach beidseitigem Angebot (geschlossene Linie) und Änderungen der pH-Werte (gestrichelte Linie) im lumen- (offene Symbole) oder blutseitigen (geschlossenen Symbole) Raum; jeder Wert repräsentiert 3-5 Versuche

trationsgradienten mit einem Verhältnis von PABA zwischen Lumen- und Blutseite von bis zu 1 : 48 bei einer Inkubationszeit von 180 min. Der intrazelluläre Gewebsgehalt zeigte nach einer Steigerung von 61,4 % nach 20 min auf 101,5 % nach 90 min eine Minderung auf 75,7 % nach 180 min (Tab.36). Dabei läßt sich allein die Steigerung zwischen 20 und 90 min statistisch sichern.

Die Bestimmung der pH-Werte der Inkubationsmedien ergab eine starke Ansäuerung der lumenseitigen Inkubationslösung (Abb.31, Tab.36). Diese Ansäuerung blieb kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum erhalten. Im Gegensatz zur Lumenseite blieb der pH-Wert des blutseitigen Mediums nach einer leichten Alkalisierung ab 45 min in einem Bereich von 7,26 stabil.

PABA wurde in einer weiteren Versuchsserie auch in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt. Auch in diesem Fall kommt es zu einer Anreicherung von PABA auf der Blutseite gegen einen Konzentrationsgradienten. Bei einer Inkubationszeit von 180 min kann

Tab.36: Verteilung von 2 mM PABA nach beidseitigem Angebot und Änderungen des pH-Wertes des Inkubationsmediums, pH Lumen/Blut bei Versuchsbeginn 7,054, jeder Wert repräsentiert einen vollständigen Versuch

Zeit	(min)		20	45	90	180
Gewebsgehalt (%)			61,4	73,9	101,5	75,6
		S.E.M.	4,5	2,4	14,9	10,4
		N	3	6	6	3
PABA Lumen (%)			45,41	37,05	15,96	1,98
		S.E.M.	0,96	1,77	3,19	0,50
		N	3	5	5	3
PABA Blut (%)			54,47	62,66	82,52	94,77
		S.E.M.	0,23	1,95	3,76	2,35
		N	3	5	5	3
pH Lumen			6,791	6,456	5,618	4,212
		S.E.M.	0,018	0,111	0,333	0,117
		N	3	3	3	3
pH Blut			7,185	7,255	7,270	7,263
		S.E.M.	0,007	0,021	0,025	0,036
		N	3	3	3	3

dabei eine Konzentration des PABA von $5,66 \pm 0,65 \%$, $N=6$, auf der Lumenseite und $90,35 \pm 0,35 \%$, $N=6$, auf der Blutseite und ein daraus resultierender Konzentrationsgradient von 1 : 16 bestimmt werden. In einem weiteren Versuchsansatz, mit PABA in einer Konzentration von 2 mM, wurde das Volumen der Inkubationslösung auf 500 μ l heraufgesetzt. Wie zu erwarten, verringerte sich sowohl die Ansäuerung des lumenseitigen Inkubates wie auch die Geschwindigkeit der Umverteilung des PABA zur Blutseite. Gleichwohl kam es auch hier zu einer Verteilung von PABA gegen einen Konzentrationsgradienten. Nach 180 min ergab sich dabei mit $29,27 \pm 2,05 \%$, $N=3$, auf der Lumenseite und $76,34 \pm 1,29 \%$, $N=3$, auf der Blutseite ein Gradient von 1 : 2,6. Der pH-Wert der lumenseitigen Inkubationslösung war von 7,054 nach dreistündiger Inkubation auf einen Wert von $6,144 \pm 0,129$, $N=3$, verschoben.

7.2.4 Inkubation bei 7°C

In einer Versuchsserie wurde der Einfluß einer Inkubationstemperatur von 7°C auf die Permeation von PABA in einem Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer unter Sauerstoffbegasung untersucht. Das mittlere Feuchtgewicht der Mukosae ist mit $8,49 \pm 0,26$ mg, $N=24$, hochsignifikant um 53,8 % gegenüber den Vergleichswerten einer Inkubation bei 37°C erhöht. Diese Steigerung resultierte dabei aus der ebenfalls hochsignifikanten Erhöhung des lumenseitigen Extrazellulärtraumes um 143 % auf ein Mittel von $3,633 \pm 0,307$ μ l, $N=12$. Der blutseitige ER ist dagegen mit $1,444 \pm 0,046$ μ l, $N=12$, gegenüber der Vergleichsgruppe statistisch signifikant erniedrigt. Der prozentuale Anteil des ER am Feuchtgewicht ist für den lumenseitigen ER mit $41,86 \pm 1,83 \%$, $N=12$ und den blutseitigen ER mit $17,35 \pm 0,62\%$, $N=12$, ebenfalls statistisch signifikant gegenüber der Vergleichsgruppe erhöht resp. erniedrigt.

Ein Vergleich der PEG-Flüsse der bei 7°C inkubierten Mukosae mit den bei 37°C inkubierten Werten zeigt sowohl für den resorptiven Fluß mit $0,357 \pm 0,043 \%$, $N=12$, wie für den sekretorischen Fluß mit $0,368 \pm 0,064 \%$, $N=12$, eine signifikante Erniedrigung der

Flußraten unter Einfluß der Kälte. Dabei läßt sich ein Q_{10} -Wert von 1,14 der Abhängigkeit der Permeation von der Temperatur ermitteln. Verglichen mit den Q_{10} -Werten des Jejunums sind damit die passiven Permeabilitäten des Colons wesentlich geringer von der Inkubationstemperatur beeinflusst.

Unter dem Einfluß der Kälte sind die Permeationsraten von PABA unabhängig von der Angebotsseite in beiden Richtungen gleich. Besonders deutlich wird dieser Befund bei einer Auftragung der Marker- gegen die Substratpermeation jeder einzelnen Kammer (Abb.32). Alle Einzelwerte ordnen sich dabei um eine Regressionsgerade, unabhängig von der Angebotsseite und der Angebotskonzentration. Ein großer Anteil der Permeation des Substrates wird dabei durch die shunt-Permeabilität des Gewebes getragen. Der, in der Regressionsanalyse der Permeationsraten bei einer Marker-Permeation von Null, verbleibende intrazelluläre Anteil der Substrat-

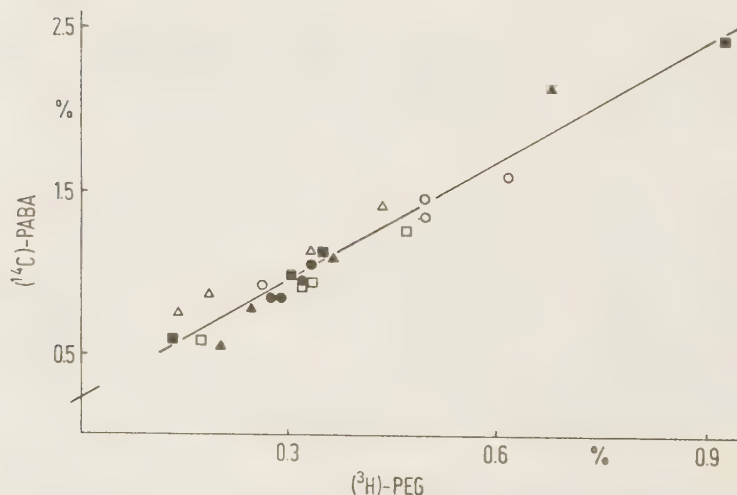


Abb.32: Einfluß einer Inkubation bei 7°C auf die Permeation von 10 µM (●), 100 µM (■) und 2 mM (▲) ^{14}C -PABA nach lumen- (offene Symbole) und blutseitigem Angebot (geschlossene Symbole) am Meerschweinchen-Colon
Regressionsgerade: $\text{Perm}_{\text{PABA}} = 0,234 + 2,42 * \text{Perm}_{\text{PEG}}$, $r = 0,971$

Permeation von 0,234 % entspricht maximal 25 % der Gesamt-Permeationsrate (Tab.37). Ein hoher Q_{10} -Wert als Maß der Einschränkung der Permeation läßt sich nur für den resorptiven Fluß ermitteln; der Q_{10} der unkorrigierten Sekretionsrate entspricht dagegen dem Q_{10} -Wert der Markerpermeation.

Der Gewebsgehalt an PABA am Inkubationsende ist im Gegensatz zur Permeationsrate weder unabhängig von der Angebotskonzentration noch von der Angebotsseite (Tab.37). In allen untersuchten Konzentrationen ist der Gewebsgehalt nach blutseitigem Angebot signifikant höher als nach lumenseitigem Angebot. Eine Umkehrung dieses Verhältnisses zugunsten eines höheren Gewebsgehaltes nach lumenseitiger Inkubation, wie bei einer Angebotskonzentration von 100 μ M und einer Inkubationstemperatur von 37°C, kann bei 7°C nicht beobachtet werden. Bei steigender Konzentration des angebotenen PABA nahm der Gewebsgehalt nach blutseitigem Angebot zwischen 100 und 2000 μ M, nach lumenseitigem Angebot aber am deutlichsten in einem Konzentrationsbereich zwischen 10 und 100 μ M ab (Tab.37).

Tab.37: Inkubation bei 7°C: Gewebsgehalt und Permeationsraten von 0,01 bis 2 mM PABA nach lumen- oder blutseitigem Angebot; Stat.Vergleich: (*-***)) Angebotsseite Lumen gegen Blut, (o-ooo) gegen nächst niedrigere Konzentration gleicher Angebotsseite

Konzentration: (mM)	0,01		0,10		2,00	
Angebotsseite:	Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
Gewebsgehalt (%)	29,85	110,98***	20,79	106,46***	16,31	57,68***
S.E.M.	3,13	9,43	3,30 ^{ns}	3,74 ^{ns}	3,15 ^{ns}	0,97 ^{ooo}
Permeation (%)	1,330	0,922*	0,926	1,285 ^{ns}	1,049	1,142 ^{ns}
S.E.M.	0,148	0,048	0,135 ^{ns}	0,405 ^{ns}	0,147 ^{ns}	0,352 ^{ns}
Q_{10}	2,59	1,24	3,08	1,14	2,83	1,13
N	4	4	4	4	4	4

7.2.5 Einfluß des pH-Wertes des Inkubationsmediums

Zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes der Inkubationslösung auf die Permeation wurde ein Puffermedium mit BisTris-Propan Puffer eingesetzt. Ein Vergleich der mit BisTris erhaltenen 'passiven' Parameter bei einem pH-Wert von 7,00 (Tab.38) mit denen des Tris-Mediums ergab bis auf das in dieser Versuchsserie signifikant geringere Feuchtgewicht der Mukosae keine statistisch absicherbaren Unterschiede.

Tab.38: pH-Abhängigkeit des Gewebsgehaltes und der Permeationsrate von 10 µM PABA nach lumen- oder blutseitigem Angebot in einem Krebs-BisTrispropan-Glukose-Mannit Puffer 37°C; statistischer Vergleich gegen jeweiligen Wert gleicher Angebotsseite mit nächst niederem pH-Wert

pH°		5,880		7,028		8,000	
FG	(mg)	5,33		4,71*		5,84***	
	S.E.M.	0,24		0,19		0,24	
	N	18		20		12	
Angebotsseite:		Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
ER	(%)	36,39	28,14	22,59*	31,49 ^{ns}	38,26*	25,42 ^{ns}
	S.E.M.	1,98	1,34	3,19	2,28	2,92	2,35
	N	9	9	10	10	8	9
Gewebsgehalt:	(%)	161,9	304,2	24,8**	124,9**	12,6*	66,5**
	S.E.M.	27,1	38,6	2,4	13,2	4,0	5,2
	N	9	9	10	10	8	9
Permeationsrate:							
PABA	(%)	40,858	1,635	8,588***	2,151 ^{ns}	4,940*	2,700 ^{ns}
	S.E.M.	3,225	0,115	1,146	0,362	0,488	0,261
	N	9	6	8	9	5	5
PEG900	(%)	1,008	0,613	0,736 ^{ns}	0,784 ^{ns}	0,985 ^{ns}	1,103 ^{ns}
	S.E.M.	0,120	0,073	0,120	0,148	0,181	0,079
	N	7	6	8	9	5	5

Eine Änderung des pH-Wertes der Inkubationslösung von 7,03 auf 5,88 oder 8,00 führt zu einer statistisch signifikanten Vergrößerung des lumenseitigen Extrazellulärarraumes und damit auch des Feuchtgewichtes (Tab.38). Auffallend sind auch die, allerdings statistisch nicht belegbaren, Steigerungen der PEG-Permeabilität

des Gewebes bei einem pH-Wert von 5,88 oder 8,00 gegen 7,03 bei einem lumenseitigen Angebot und die Steigerung bei pH 8,00 und blutseitigem Angebot.

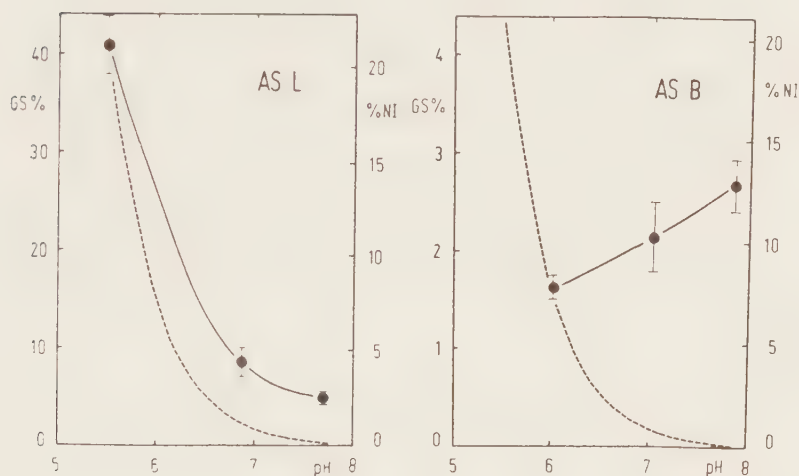


Abb. 32b: Terminaler pH-Wert des Inkubationsmediums (Abszisse) und Permeationsraten von 10 μ M PABA (Ordinate) bei lumen- (links) und blutseitigem (rechts) Substratangebot. Permeationsraten (GS%, geschlossene Linie) jeweils linke Skaleneinteilung, Prozent an nichtionisiertem PABA (NI%, gestrichelte Linie) jeweils rechte Skaleneinteilung, jeder Wert entspricht 5-9 Versuchen

Die Permeationsraten des PABA sind bei gleichem Ausgangs-pH im Bis-Tris Medium geringer als im Tris-Puffer. Dieser Effekt läßt sich über die höhere Puffer-Kapazität des Bis-Tris Puffers erklären. Verändert sich der pH-Wert des Tris-Mediums im lumenseitigen Inkubat im Mittel von einem Ausgangswert von 7,01 auf 6,53 (Tab.34), so änderte sich der pH-Wert des Bistris-Mediums von 7,03 auf 6,87 (Abb.33,Tab.39). Die Alkalisierung des blutseitigen Inkubates ist mit 7,08 (Tab.39) gegenüber 7,16 in Tris-Medium (Tab.34) ebenfalls eingeschränkt. Parallel zur geringeren Ansäuerung des lumenseitigen Mediums ist der Gewebsgehalt am Versuchsende gegenüber dem Tris-Medium um mehr als die Hälfte herabgesetzt. Nach

blutseitigem Angebot ergab sich keine Differenz im Gewebsgehalt zwischen BisTris-Propan- und Tris-Puffer.

Die Resorptionsrate von PABA nach lumenseitigem Angebot ist deutlich mit dem Anteil der freien Säure korreliert (Abb.32b,Tab.38). Rechnet man die vom Grade der Ionisation relativ unabhängigen shunt-Permeabilitäten mit ein, so entspricht die Flußrate dem Anteil der freien Säure. Bei einem blutseitigem Angebot ist, bezieht man die im alkalischen Bereich angestiegenen shunt-Permeabilitäten mit ein, keine Abhängigkeit der Permeation vom Grade der Ionisation zu erkennen (Abb.32b).

Tab.39 : pH-Wert Änderungen eines Krebs-Bistrispropan-Glukose-Mannit Puffers während der Inkubation, pH_0 Ausgangs- pH_{45} Endwert nach 45 min

Lumenseitige Inkubationslösung:

Ausgangswert :					
pH_0	5,880	6,285	7,028	7,580	8,000
Endwert :					
pH_{45}	5,497	6,130	6,868	7,370	7,689
S.E.M.	0,073	0,013	0,011	0,015	0,031
N	10	8	12	8	10

Blutseitige Inkubationslösung:

Ausgangswert :					
pH_0	5,880	6,285	7,028	7,580	8,000
Endwert :					
pH_{45}	6,092	6,400	7,080	7,460	7,848
S.E.M.	0,026	0,005	0,014	0,017	0,033
N	10	8	12	8	10

Eine Erhöhung des pH-Wertes von 5,88 auf 7,03 und 8,00 führt, sowohl nach lumenseitigem wie nach blutseitigem Angebot, in allen Fällen zu einer statistisch signifikanten Verringerung des Gehaltes an Tracer im Gewebe (Tab.38). Vergleichbar mit den Gewebsgehalten im Tris-Medium ist dieser nach blutseitigem Angebot bei allen untersuchten pH-Werten statistisch signifikant größer als nach lumenseitigem Angebot. Die hier zu beobachtenden Abhängigkeiten der Flußraten, wie auch der Gewebsgehalte, vom pH-Wert des Inkubationsmediums konnte in einer von dieser Serie unabhängigen

Versuchsreihe mit einem Krebs-Hepes-Glukose-Mannit Medium mit verschiedenen pH-Werten in allen Punkten bestätigt werden.

Besonders interessant ist ein Vergleich der pH-Wert Änderungen der lumen- und blutseitigen Inkubationslösung bei einem unterschiedlichen Ausgangs pH-Wert. Die lumenseitige Inkubationslösung wird dabei in allen Fällen, sowohl im Bistris wie im Hepes-Puffer, auf einen acideren pH-Wert angesäuert (Abb.33). Eine blutseitige Alkalisierung des Inkubationsmediums läßt sich nur für einen pH-Wert des Inkubationsmediums kleiner 7,2 belegen. Steigt der pH-Wert des Inkubationspuffers über diesen Wert, kommt es zu einer blutseitigen Ansäuerung der Inkubationslösung (Abb.33). Zwischen Bistris und Hepes-Medium bestehen, bis auf geringe Unterschiede in der Pufferkapazität, keine prinzipiellen Unterschiede.

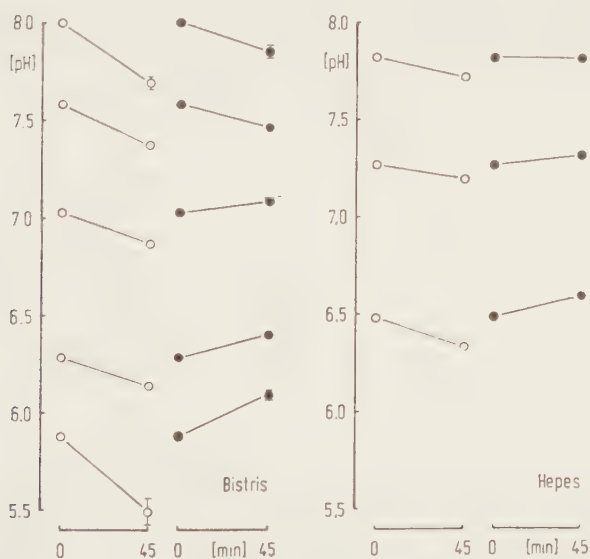


Abb.33: pH-Wert Änderungen des Puffermediums im lumen- (offene Symbole) und blutseitigem Inkubat (geschlossene Symbole) während der Inkubation, Krebs-Bis-Tris-Glukose-Mannit (linke Bildhälfte) und Krebs-Hepes-Glukose-Mannit (rechte Bildhälfte)

7.2.6. Inkubation unter Einfluß von Phenoxybenzamin

Nach Untersuchungen von Kilian und Lauterbach (1978) permeiert β -Naphtholorange am Colon des Meerschweinchens stärker in sekretorischer als in resorptiver Richtung. Die Sekretionsrate ließ sich dabei über eine zweistündige Vorinkubation und anschließender Inkubation mit 0,11 mM Phenoxybenzamin (PBA) in der blutseitigen Inkubationslösung einschränken (Lauterbach, 1983). Aufgrund dieser Inhibition erschien es von Interesse, den Einfluß von lumen- oder blutseitig gegebenem PBA auf die Permeation von PABA zu untersuchen. Mit in die Untersuchung einbezogen wurden die Änderungen der pH-Werte des Inkubationsmediums nach blutseitig gegebenem PBA. Eine ausführliche Darstellung des Einflusses von PBA auf Metabolisierung und Metabolitentransport findet sich an anderer Stelle (Kap. 3.1.4.2).

Tab.40: Der Einfluß von PBA auf die Änderungen der pH-Werte des lumen- und blutseitigen Inkubationsmediums während einer Inkubation von 45 min. Kammern 2h mit Puffer ohne (Kontrolle) und mit PBA vorinkubiert; Statistischer Vergleich: (*-***) PBA gegen Kontrollen

	Kontrolle		PBA, 0,11 mM blutseitig	
	Lumen	Blut	Lumen	Blut
pH ₀	7,033	7,033	7,025	7,025
pH ₄₅	6,700	7,134	6,903	6,972
S.E.M.	0,044	0,018	0,020	0,014
H ⁺ -Äquivalente (nmol)	+405,3	-176,7	+183,7***	+ 62,9***
S.E.M.	45,3	40,0	30,6	22,3
N	12	12	10	10
Δ H ⁺ (nmol)	+228,6		+246,6	

Um den Einfluß der zweistündigen Vorinkubation des Gewebes abschätzen zu können, wurden Kammern über den gleichen Zeitraum mit Versuchspuffer vorinkubiert. Verglichen mit Kammern ohne Vorinkubation ist die Permeationsrate in resorptiver Richtung von 23,0 % auf 13,6 % herabgesetzt. Eine Netto-Resorption der Säure kann mit 94,6 % Wahrscheinlichkeit nicht mehr statistisch sicher belegt werden. Bezieht man die Analyse jedoch auf Versuche am

jeweils gleichen Versuchstier, so läßt sich in allen Fällen eine verbleibende Netto-Resorption auch statistisch nachweisen. Ebenfalls vermindert ist die lumenseitige Ansäuerung des Inkubationsmediums. Kommt es ohne Vorinkubation zu einer Ansäuerung von einem Ausgangswert von 7,01 auf 6,53 (Tab.34), fällt die pH-Wert Änderung nach einer zweistündigen Vorinkubation mit 7,02 als Ausgangs- und 6,70 als End-pH Wert geringer aus (Tab.40). Weniger von der Vorinkubation beeinflusst sind die Permeationsraten in sekretorischer Richtung und die Gewebsgehalte am Versuchsende.

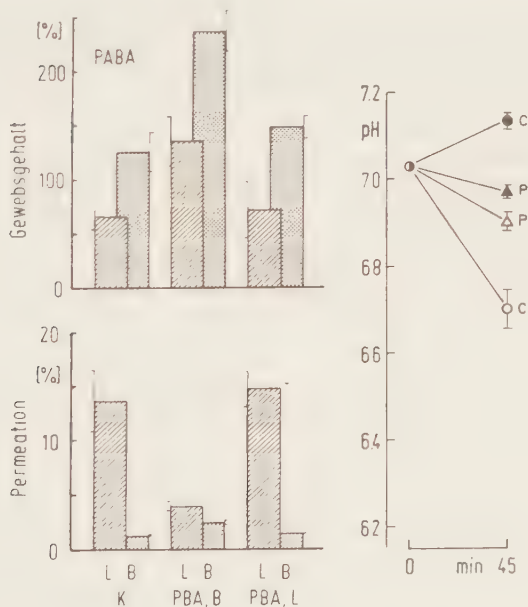


Abb.34: Einfluß von 0,11 mM Phenoxybenzamin (PBA) auf Gewebsgehalte (links oben) und Permeationsraten (links unten) von 10 μ M lumen- (L) oder blutseitig (B) angebotenen PABA und auf die Veränderungen der pH-Werte des Inkubationsmediums (rechts). Kammern 2h mit PBA lumen- (PBA,L) oder blutseitig (PBA,B) vorinkubiert. Rechte Bildhälfte: pH-Änderungen im lumen- (offene Symbole) oder blutseitigem (geschlossene Symbole) Inkubat in Kontrollen (C) oder bei blutseitig gegebenem PBA (P), Anzahl der Versuche s.Tab.40/41

Die Permeation von PABA und sein Gewebsgehalt kann über eine lumenseitige Gabe von PBA nicht beeinflusst werden (Abb.34,Tab.41). Nach blutseitigem Einsatz des Inhibitors ist dagegen einerseits der resorptive Fluß der Säure statistisch signifikant vermindert, andererseits der sekretorische Fluß statistisch hochsignifikant erhöht. Eine Netto-Resorption läßt sich in keinem Fall statistisch absichern. Der Gewebsgehalt der Mukosa am Versuchsende ist, sowohl nach lumen- wie nach blutseitigem Angebot von PABA, statistisch signifikant erhöht.

Tab.41: Einfluß von Phenoxybenzamin (PBA) auf Gewebsgehalt und Permeationsraten von 10 μ M PABA, die Mukosae wurden 2 Stunden mit Puffer (mit 2hVK), mit 0,11 mM lumenseitig gegebenem PBA (+PBA;L) oder blutseitig gegebenem PBA (+PBA;B) vorinkubiert; Statistischer Vergleich: Inkubationen mit PBA (+PBA;L oder +PBA;B) gegen die Kontrolle (mit 2h VK) bei gleicher Angebotsseite des Substrates

Angebotsseite:	mit 2hVK		+PBA;L		+PBA;B	
	Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
Gewebsgehalt (%)	55,9	126,2	70,8 ^{ns}	148,1 ^{ns}	135,4 ^{**}	236,9 ^{**}
S.E.M.	11,7	17,7	25,9	9,7	22,7	18,8
N	8	7	2	2	7	7
Permeation (%)	13,65	1,165	14,75 ^{ns}	1,415 ^{ns}	3,843 [*]	2,395 ^{**}
S.E.M.	2,88	0,131	1,61	0,019	0,467	0,216
N	8	7	2	2	6	7

Die Ansäuerung des lumenseitigen Inkubationsmediums ist unter Einfluß des blutseitig gegebenem PBA hochsignifikant gehemmt (Abb.34,Tab.40). Noch stärker macht sich diese Inhibition jedoch im Mechanismus einer blutseitigen Alkalisierung bemerkbar; hier kommt es unter Einfluß des, in diesem Falle ebenfalls, blutseitig gegebenem Agens zu einer völligen Unterdrückung der Alkalisierung und einer leichten Ansäuerung des blutseitigen Mediums. In den Versuchen mit lumenseitig gegebenem PBA war aus technischen Gründen eine Erfassung der pH-Werte der Inkubationslösung nicht möglich. Die nur geringfügig beeinflussten Gewebsgehalte und Permeationsraten lassen jedoch einen Einfluß von lumenseitig gegebenem PBA auf den Mechanismus der Ansäuerung/Alkalisierung unwahrscheinlich erscheinen.

7.2.7 K⁺-freie Inkubation

Über Inkubationsmedien, in denen einzelne Ionenspezies fehlten, sollte in einer Versuchsserie der Mechanismus der luminalen Ansäuerung selektiv gehemmt werden. Um den Einfluß des Kaliums auf die Ansäuerung/Alkalisierung zu untersuchen, wurden in einer Versuchsserie die Kammern beidseitig in einem kaliumfreien Krebs-Tris-Glukose-Mannit Medium inkubiert. In allen Inkubaten wurde PABA im lumen- oder im blutseitigen Medium in einer Konzentration von 10 μM mitgeführt.

Gegenüber den im gleichen Versuch mitgeführten Kontrollkammern kommt es dabei zu einer statistisch hochsignifikanten Reduktion sowohl der Ansäuerung der Lumenseite wie auch der Alkalisierung der Blutseite (Abb.35,Tab.42). Parallel zur Verminderung der pH-Wert Änderungen kann eine ebenfalls signifikante Reduktion der Permeation nach lumenseitigem Angebot beobachtet werden (Tab.42). Die Permeation in Gegenrichtung ist dagegen parallel zum acideren

Tab. 42: Einfluß eines K⁺-freien Inkubationsmediums auf pH-Wert Änderungen der Inkubationslösungen und die Permeation von 10 μM PABA; Statistischer Vergleich gegen Kontrolle

	Kontrolle		K ⁺ -frei	
	Lumen	Blut	Lumen	Blut
pH ₀	6,986	6,986	7,002	7,002
pH _{4,5}	6,369	7,194	6,802	7,045
S.E.M.	0,024	0,008	0,017	0,012
H ⁺ -Äquivalente (nmol)	+585,0	-349,9	+260,8***	- 68,5***
S.E.M.	12,6	15,5	20,0	19,1
N	14	14	14	14
ΔH^+	+235,1		+192,3	
Angebotsseite	Lumen	Blut	Lumen	Blut
Gewebsgehalt (%)	56,2	115,8	25,6 **	115,0 ^{ns}
S.E.M.	8,3	8,9	2,1	9,8
N	7	7	6	8
Permeationsrate (%)	32,15	1,39	9,87**	3,11**
S.E.M.	4,04	0,17	1,12	0,41
N	7	7	6	8

pH-Wert des blutseitigen Mediums signifikant erhöht. Der Gewebsgehalt nach blutseitigem Angebot bleibt gegenüber den Kontrollen unverändert. Der Gewebsgehalt nach lumenseitigem Angebot ist dagegen, wie die Permeationsrate, statistisch belegbar erniedrigt.

7.2.8 Cl⁻-freie Inkubation

Für die Abgabe basischer Äquivalente in das blutseitige Inkubat kann ein elektroneutraler Transport von Bikarbonationen im Austausch gegen Chloridionen diskutiert werden. Eine Inkubation in einem zu Versuchsbeginn chloridfreien Medium sollte danach zu einer Minderung der blutseitigen Alkalisierung führen. Im Versuchsansatz wurden die Mukosae dabei beidseitig, lumenseitig und blutseitig in einem chloridfreien Puffer inkubiert und die erhal-

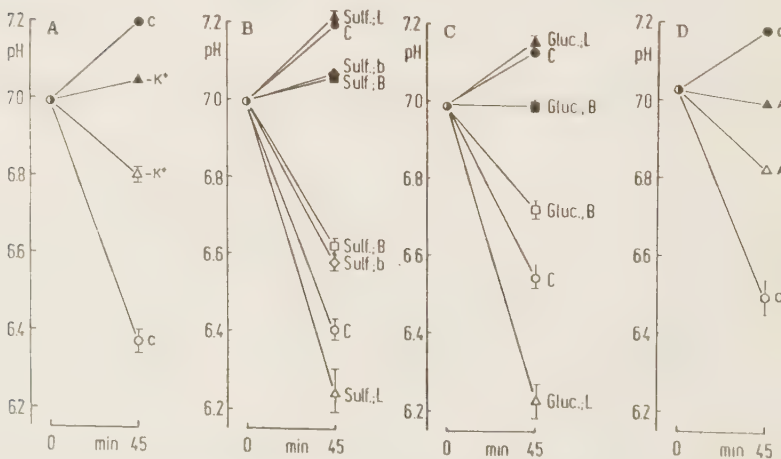


Abb. 35: pH-Wert Änderungen des lumenseitigen (offene Symbole) und des blutseitigen (geschlossene Symbole) Inkubationsmediums unter Einfluß einer kaliumfreien Inkubation (A), einer chloridfreien beid- b, lumen- L oder blutseitigen B Inkubation mit Sulfat (B, Sulf.) und Gluconat (C, Gluc.) als Ersatz-Ion und unter Einfluß von 0,1 mM Acetazolamid (D, Kammern 20 min vorinkubiert) gegen die in den Versuchen mitgeführten Kontrollen; Anzahl von Versuchen pro aufgetragenem Wert s. Tab.42-46

ten gebliebene Ansäuerung/Alkalisierung, wie auch der Transport und Gewebsgehalt von 10 μ M PABA, mit den mitgeführten Kontrollkammern verglichen. Als chloridfreie Inkubationsmedien wurden Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer gewählt, in denen alle Chloridionen durch Sulfat oder durch Gluconat ersetzt waren.

Nach beidseitig chloridfreier Inkubation mit dem Medium, in dem Chlorid durch Sulfat ersetzt wurde, kommt es zu einer ausgeprägten und statistisch hochsignifikanten Verminderung der blutseitigen Alkalisierung (Abb.35,Tab.43). Die lumenseitige Ansäuerung wird, wenn auch nicht im gleichen Ausmaß wie die Alkalisierung, ebenfalls hochsignifikant eingeschränkt. Der Einfluß einer blutseitigen chloridfreien Inkubation mit Sulfat als Ersatz-Ion (Abb.35, Tab.44) entspricht weitgehend den Ergebnissen nach beidseitiger chloridfreier Inkubation. Nach lumenseitig chloridfreier Inkubation kommt es zu einer verstärkten Ansäuerung des lumenseitigen Mediums und, parallel, zu einer ebenfalls verstärkten Alkalisierung der blutseitigen Inkubationslösung (Abb.35, Tab.44). Dieses Ergebnis wird besonders in den Versuchen mit Gluconat als Ersatz-Ion deutlich (Tab.45). In diesem Fall ist die lumenseitige Ansäuerung statistisch hochsignifikant gegenüber den mitgeführten Kontrollen erhöht. Die Inhibition der Ansäuerung/ Alkalisierung durch blutseitig chloridfreie Inkubation und die Steigerung der Ansäuerung / Alkalisierung durch lumenseitig chloridfreie Inkubation ist von der Wahl des Ersatz-Ions weitgehend unabhängig. Dies wird besonders deutlich, wenn man bei der Analyse die in dieser Präparation üblichen Schwankungen der Ansäuerung/Alkalisierung zwischen den einzelnen Versuchen (vgl. Kontrollen Tab.43-45) berücksichtigt. Damit wird deutlich, daß weder Sulfat noch Gluconat die Funktion des Chlorides im Rahmen der Ansäuerung/Alkalisierung in einem erkennbaren Ausmaß ersetzen kann.

Die Permeation des PABA nach lumenseitigem Substratangebot folgt den durch eine chloridfreie Inkubation bewirkten pH-Wert Änderungen. So kommt es nach Inhibition der lumenseitigen Ansäuerung durch beid- oder blutseitig chloridfreier Inkubation zu einer, ge-

Tab. 43: Einfluß eines Cl⁻-freien Inkubationsmediums (Cl⁻ durch SO₄²⁻ ersetzt) auf pH-Wert Änderungen der Inkubationslösungen und die Permeation von 10 µM PABA; Statistischer Vergleich gegen Kontrolle

	Kontrolle		Cl ⁻ -frei, beidseitig	
	Lumen	Blut	Lumen	Blut
pH ₀	6,986	6,986	6,983	6,983
pH ₄₅	6,369	7,194	6,581	7,071
S.E.M.	0,024	0,008	0,023	0,013
H ⁺ -Äquivalente (nmol)	+585,0	-349,9	+445,8***	-138,0***
S.E.M.	12,6	15,5	20,9	22,0
N	14	14	14	14
ΔH ⁺	+235,1		+307,8	
Angebotsseite	Lumen	Blut	Lumen	Blut
Gewebsgehalt (%)	56,2	115,8	76,2 ^{ns}	186,3 ^{**}
S.E.M.	8,3	8,9	20,0	17,8
N	7	7	7	7
Permeationsrate (%)	32,15	1,39	20,58*	1,41 ^{ns}
S.E.M.	4,04	0,17	2,73	0,17
N	7	7	7	7

genüber den Kontrollen, verminderten Substratresorption (Tab.43-Tab.45). Die über eine chloridfreie Inkubation der Lumenseite bewirkte Steigerung der Ansäuerung des lumenseitigen Mediums ist von einer parallelen Steigerung der Resorptionsquote begleitet, die sich allerdings nicht statistisch absichern läßt. Eine Beeinflussung der Permeation nach blutseitigem Angebot kann nur in den Versuchen mit dem Gluconat-Puffer beobachtet werden (Tab.45). Hier kommt es nach lumenseitig chloridfreier Inkubation zu einer statistisch schwach signifikanten Reduktion und nach blutseitig chloridfreier Inkubation zu einer statistisch nicht abzusichernden Steigerung der Permeationsraten. Die Effekte einer chloridfreien Inkubation auf die Sekretionsrate sind jedoch insgesamt nur geringfügig und einer Auswertung nur über die große Anzahl an Versuchen mit dem Gluconat-Medium zugänglich.

Tab.44: Einfluß eines Cl⁻-freien Inkubationsmediums (Cl⁻ durch SO₄²⁻-ersetzt) der Lumen- oder Blutseite auf pH-Wert Änderungen der Inkubationslösungen und die Permeation von 10 µM PABA; Stat.Vergleich gegen Kontrolle

	Kontrolle		Cl ⁻ -frei, lumenseitig		Cl ⁻ -frei, blutseitig	
	Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
pH ₀	6,997	6,997	6,997	6,997	6,997	6,997
pH _{4.5}	6,360	7,197	6,247	7,213	6,620	7,059
S.E.M.	0,040	0,019	0,057	0,014	0,018	0,012
H ⁺ -Äquivalente (nmol)						
	+604,2	-314,4	+617,0 ^{ns}	-335,1 ^{ns}	+439,4 ^{**}	- 97,2 ^{**}
S.E.M.	14,2	35,3	47,3	44,9	26,1	5,2
N	6	6	4	4	2	2
ΔH ⁺	+289,8		+281,9		+342,2	
Angebotsseite	Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
Gewebsgehalt (%)	76,8	106,9	64,8 ^{ns}	137,0 ^{ns}	72,0	170,8
S.E.M.	5,1	13,0	5,1	3,1	—	—
N	3	3	2	2	1	1
Permeationsrate (%)	32,93	1,82	38,42 ^{ns}	1,95	18,48	1,54
S.E.M.	9,23	0,07	0,85	—	—	—
N	3	3	2	1	1	1

Eine Analyse der Beeinflussung der Gewebsgehalte durch die Inkubation im chloridfreien Medium erweist sich aufgrund der großen Schwankungen der Einzelwerte als schwierig. Im Trend ist der Gewebsgehalt nach blutseitigem Angebot des Substrates PABA und blut- oder beidseitig chloridfreier Inkubation deutlich erhöht (Tab.43-Tab.45). Für den Puffer mit Gluconat als Ersatz-Anion läßt sich eine Verminderung des Gewebsgehaltes nach blutseitigem Angebot und lumenseitig chloridfreier Inkubation schwach signifikant belegen (Tab.45). Dagegen kommt es, wenn auch statistisch nicht signifikant, zu einer Steigerung im vergleichbaren Fall mit Sulfat als Ersatz-Ion (Tab.44). Nach lumenseitigem Angebot kann keine statistisch belegbare Änderung im Gewebsgehalt beobachtet werden (Tab.43-45).

Tab. 45: Einfluß eines Cl⁻-freien Inkubationsmediums (Cl⁻ durch Gluconat ersetzt) der Lumen- oder Blutseite auf pH-Wert Änderungen der Inkubationslösungen und die Permeation von 10 µM PABA; Stat.Vergleich gegen Kontrolle

	Kontrolle		Cl ⁻ -frei, lumenseitig		Cl ⁻ -frei, blutseitig	
	Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
pH ₀	7,003	7,003	6,977	6,977	6,970	6,970
pH ₄₅	6,545	7,129	6,232	7,154	6,726	6,977
S.E.M.	0,032	0,013	0,045	0,013	0,022	0,014
H ⁺ -Äquivalente (nmol)						
	+480,9	-195,9	+587,4***	-253,3 ^{ns}	+325,8***	-45,9***
S.E.M.	22,0	20,5	17,2	22,2	20,6	8,2
N	17	17	29	29	19	19
Δ H ⁺	+285,0		+334,1		+279,9	
Angebotsseite	Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
Gewebsgehalt (%)	55,6	163,9	80,3 ^{ns}	121,5 *	49,4 ^{ns}	234,1 ^{ns}
S.E.M.	10,4	19,3	9,8	8,5	8,3	24,4
N	13	5	19	10	9	10
Permeationsrate (%)	22,87	1,67	25,31 ^{ns}	1,28*	11,91**	1,82 ^{ns}
S.E.M.	2,53	0,16	2,08	0,09	1,38	0,10
N	11	5	16	10	9	10

7.2.9 Inkubation unter Einfluß von Acetazolamid

Carter und Parsons (1970) konnten im Meerschweinchen-Colon eine ähnlich hohe Aktivität der Carboanhydrase wie in der Magen-Mukosa bestimmen. Damit erscheint es denkbar, das ein Teil der ausgeschiedenen Protonen und Bikarbonationen über die Aktivität dieses Enzyms in der Darmmukosa bereitgestellt wird. Nach Rechkemmer (1981) kann die Carboanhydraseaktivität des Meerschweinchen-Colons durch 0,1 mM Acetazolamid vollständig gehemmt werden. In einer Versuchsserie wurde nun der Einfluß von 0,1 mM Acetazolamid auf die Ansäuerung/Alkalisierung untersucht. In Vorversuchen konnte dabei eine deutliche Reduktion der Ansäuerung durch das beidseitig dem Inkubationsmedium zugegebene Acetazolamid beobachtet werden. Dieser Effekt läßt sich durch eine 20 minütige Vorinkubation des Gewebes mit dem Inhibitor weiter steigern. PABA wurde in diesen

Versuchen in der Inkubationslösung in einer Konzentration von 10 μ M lumen- oder blutseitig mitgeführt.

Acetazolamid hemmt, statistisch hochsignifikant, den Mechanismus der lumenseitigen Ansäuerung (Abb.35,Tab.46). Eine blutseitige Alkalisierung des Inkubationsmediums kann unter Einfluß von Acetazolamid nicht mehr beobachtet werden. Eine leichte Ansäuerung des blutseitigen Mediums kann als statistisch schwach signifikant belegt werden.

Die Permeationsrate des Substrates nach lumenseitigem Angebot ist unter Einfluß der verminderten lumenseitigen Ansäuerung statistisch signifikant vermindert (Tab.46). Die Permeationsrate in sekretorischer Richtung zeigt dagegen keine Abhängigkeit vom veränderten pH-Wert des Inkubationsmediums. Die Gewebsgehalte der Mukosae entziehen sich aufgrund sehr großer Abweichungen der Kontrollkammern vom Mittel aller unter 10 μ M im Krebs-Tris Medium gewonnenen Werte einer weiteren Analyse.

Tab. 46: Einfluß von 0,1 mM Acetazolamid auf pH-Wert Änderungen der Inkubationslösungen und die Permeation von 10 μ M PABA; Kammern 20 min mit Acetazolamid oder Puffer vorinkubiert; Statistischer Vergleich gegen die Kontrolle

	Kontrolle		Acetazolamid	
	Lumen	Blut	Lumen	Blut
pH ₀	7,030	7,030	7,024	7,024
pH ₁₅	6,494	7,178	6,843	6,995
S.E.M.	0,045	0,013	0,008	0,010
H ⁺ -Äquivalente (nmol)	+576,0	-253,3	+211,2***	+ 43,6***
S.E.M.	27,8	24,6	40,8	15,1
N	6	6	6	6
Δ H ⁺	+327,7		+167,6	
Angebotsseite	Lumen	Blut	Lumen	Blut
Permeationsrate (%)	19,46	2,11	8,95**	1,77 ^{ns}
S.E.M.	1,20	0,34	0,66	0,30
N	3	3	3	3

7.2.10 Inkubation unter Einfluß von Ouabain

Suzuki (1984) konnte durch lumenseitig gegebenes Ouabain eine lumenseitige Protonen-sekretion an der isolierten Meerschweinchen-Mukosa fast vollständig unterdrücken. Andere Autoren setzen dagegen Ouabain an der Kaninchen-Mukosa zur selektiven Hemmung der Kalium-Sekretion ein (Mc Cabe und Mitarbeiter, 1982, 1984). Um die Wirkung dieses Herzglykosides auf den Ansäuerungsmechanismus in unserem Präparat zu untersuchen, wurden 1 mM Ouabain in einer Versuchsserie lumen- oder blutseitig eingesetzt.

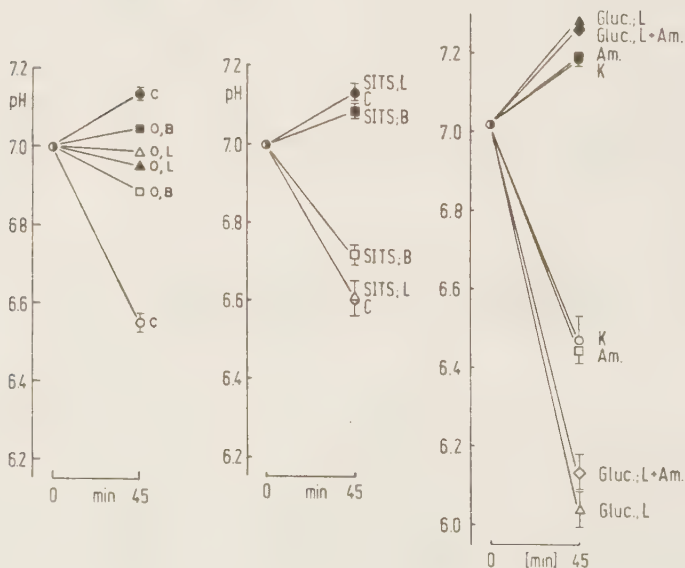


Abb. 36: pH-Wert Änderungen des lumenseitigen (offene Symbole) und des blutseitigen (geschlossene Symbole) Inkubationsmediums unter Einfluß von 1 mM lumen- (L) und blutseitigem (B) Ouabains (O, erstes Bild), SITS (S, zweites Bild) oder lumenseitigem Amilorids (Amil) mit und ohne lumenseitig chloridfreien Inkubation (Gluconat-Puffer, Gluc., drittes Bild) gegen mitgeführte Kontrollen; alle Versuche mit 10 μ M PABA; jeder Wert entspricht 4 bis 14 Versuchen

Lumenseitig gegebenes Ouabain führt zu einer fast vollständigen Unterdrückung der lumenseitigen Ansäuerung (Abb.36,Tab.47). Damit erweist sich im Vergleich zu anderen Versuchen Ouabain als wirksamster Inhibitor des lumenseitigen Ansäuerungsmechanismus. Eine Alkalisierung der blutseitigen Inkubationslösung kann unter dieser Inkubationsbedingung ebenfalls nicht beobachtet werden (Abb.36, Tab.47). Stattdessen kommt es zu einer leichten Ansäuerung des blutseitigen Mediums. Blutseitig gegebenes Ouabain führt im geringeren Ausmaß als der lumenseitig gegebene Inhibitor ebenfalls zu einer statistisch signifikanten Hemmung der Ansäuerung/ Alkalisierung (Abb.36,Tab.47).

Die Permeationsraten des Substrates verhalten sich entsprechend den veränderten pH-Werten. Nach lumenseitig gegebenem Ouabain kommt es dabei zu einer hochsignifikanten Erniedrigung des resorptiven und einer signifikanten Erhöhung des sekretorischen

Tab. 47: Einfluß von 1 mM lumen- oder blutseitig gegebenem Ouabain auf pH-Wert Änderungen der Inkubationslösungen und die Permeation von 10 μ M PABA; Statistischer Vergleich gegen die Kontrolle

	Kontrolle		Ouabain, 1 mM lumenseitig		Ouabain, 1 mM blutseitig	
	Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
pH ₀	7,001	7,001	7,003	7,003	7,002	7,002
pH ₄₅	6,551	7,136	6,985	6,952	6,886	7,049
S.E.M.	0,025	0,012	0,006	0,008	0,009	0,011
H ⁺ -Äquivalente (nmol)						
	+492,5	-211,7	+ 31,6***	+ 70,3***	+165,3***	- 68,4***
S.E.M.	24,7	19,3	9,6	8,3	20,6	8,2
N	14	14	13	13	13	13
Δ H ⁺	+280,8		+101,9		+96,9	
Angebotsseite	Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
Gewebsgehalt (%)	42,9	422,1	16,9 ns	193,5 *	18,6 ns	216,3*
S.E.M.	30,7	69,8	4,1	29,7	4,9	17,7
N	7	7	7	10	6	7
Permeationsrate (%)	19,50	2,53	3,87***	4,60**	5,25***	5,93***
S.E.M.	1,61	0,23	0,48	0,49	0,80	0,48
N	7	7	7	10	6	7

Flußes (Tab.47). Im Resultat ist die Permeationsrate nach blutseitigem Angebot, wenn auch statistisch nicht signifikant, höher als die nach lumenseitigem Angebot. Dies steht in Übereinstimmung mit der, bei den pH-Messungen gefundenen, stärkeren Ansäuerung des blut- als des lumenseitigen Inkubationsmediums. Nach blutseitig gegebenem Ouabain sind die Permeationsraten des PABA in ähnlicher Weise wie nach lumenseitiger Gabe verändert (Tab.47). Durch die hochsignifikante Verminderung des resorptiven wie auch die hochsignifikante Steigerung des sekretorischen Flusses werden in diesem Fall beide Permeationsraten gleich.

Der Gewebsgehalt bei lumenseitigem Angebot des Substrates PABA ist sowohl nach lumen- wie auch nach blutseitig gegebenem Ouabain auf weniger als die Hälfte herabgesetzt. Gleiches gilt bei blutseitigem Angebot gegenüber den mitgeführten Kontrollen. Die Gewebsgehalte der Kontrollen selbst weichen jedoch innerhalb dieser Versuchsserie stark von den sonst erhaltenen Werten ab. Dabei ist der Gewebsgehalt bei lumenseitigem Angebot im Vergleich zu gering, bei blutseitigem Angebot jedoch um einen Faktor größer zwei zu hoch. Vergleicht man den Gewebsgehalt unter Ouabain mit dem aller Versuche der Kontrollbedingung, so wird eine Reduktion bei lumenseitigem Angebot, jedoch keine Änderung bei blutseitigem Angebot deutlich (Tab.22,Tab.47).

7.2.11 Inkubation unter Einfluß von SITS

SITS ist ein bekannter Inhibitor verschiedener Anionencarrier. Daher war es von besonderem Interesse, den Einfluß von SITS auf die Alkalisierung der blutseitigen Inkubationslösung, aber auch auf die Permeation von PABA zu untersuchen. Bei gleichzeitiger Inkubation von SITS und PABA bildete sich ein neuer chemischer Körper, der bedeutend polarer als PABA war. Aus diesem Grunde war es nicht möglich, PABA und SITS im Versuch zusammen auf der Ange-

Tab. 48: Einfluß von 1 mM lumen- oder blutseitig gegebenes SITS auf pH-Wert Änderungen der Inkubationslösungen und die Permeation von 10 μ M PABA; Statistischer Vergleich gegen die Kontrolle

	Kontrolle		SITS, 1 mM lumenseitig		SITS, 1 mM blutseitig	
	Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
pH ₀	6,995	6,995	6,994	7,000	6,994	7,000
pH ₄₅	6,602	7,126	6,611	7,133	6,717	7,085
S.E.M.	0,039	0,014	0,035	0,019	0,025	0,019
H ⁺ -Äquivalente (nmol)						
	+503,1	-253,9	+488,6 ^{ns}	-254,3 ^{ns}	+416,1*	-189,5 ^{ns}
S.E.M.	33,5	19,5	12,8	26,1	36,5	45,9
N	6	6	8	7	7	7
Δ H ⁺	+249,2		+234,3		+226,6	
Angebotsseite	Lumen	Blut			Lumen	Blut
Gewebsgehalt (%)	22,2	156,3	134,2 ^{ns}		53,2 ^{ns}	
S.E.M.	8,3	22,3	23,4		11,8	
N	6	11	13		11	
Permeationsrate (%)	17,470	1,717	2,007 ^{ns}		19,154 ^{ns}	
S.E.M.	3,095	0,131	0,222		2,419	
N	6	5	11		11	

botsseite einzusetzen. Bei einer Inkubation von SITS und PABA mit gegenüberliegenden Seiten des Präparates kommt es, wahrscheinlich durch den Schutz der freien Aminogruppe des PABA nach der metabolischen Acetylierung, zu keiner weiteren Umsetzung mit SITS. PABA wurde in einer Konzentration von 10 μ M in einem Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer eingesetzt.

SITS hemmt den Mechanismus der luminalen Ansäuerung ausschließlich nach blutseitiger Gabe (Abb.36,Tab.48). Blutseitig gegebenes SITS hemmt den Mechanismus der Ansäuerung nur unvollständig und statistisch schwach signifikant. Die verminderte Alkalisierung der Blutseite läßt sich statistisch nicht absichern. Ein Einfluß von SITS auf die Permeation oder den Gewebsgehalt von PABA kann in dieser Versuchsserie nicht belegt werden (Tab.48).

7.2.12 Inkubation unter Einfluß von Amilorid und Omeprazol

Die Inhibitoren Amilorid und Omeprazol inhibieren spezifisch den Na^+/H^+ -Carrier und die (K^+/H^+) -ATPase. Um den Mechanismus der stimulierten Ansäuerung bei lumenseitig chloridfreier Inkubation auf eine Beteiligung dieser Permeasen zu überprüfen, Amilorid in diesem Fall ebenfalls eingesetzt. Beide Substanzen wurden entsprechend der Lokalisation des Ansäuerungsmechanismus in der apikalen Membran der lumenseitigen Inkubationslösung zugegeben. Für Omeprazol wurde eine Konzentration von 10 und 250 μM für Amilorid 2 mM gewählt. PABA wurde in dieser Serie nur lumenseitig in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt.

Tab. 49: Einfluß von 2 mM Amilorid auf die pH-Wert Änderungen der Inkubationslösungen mit und ohne Stimulation der lumenseitigen Ansäuerung über eine lumenseitig chloridfreie Inkubation (Gluconat-Puffer) und der Permeation von 10 μM lumenseitig angebotenem PABA; Stat. Vergleich: Kammern mit Amilorid gegen Kontrolle

	Chlorid-Puffer, Lumen				Gluconat-Puffer, Lumen			
	Kontrolle		Amilorid		Kontrolle		Amilorid	
	Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
pH ₀	7,016	7,019	7,016	7,019	7,021	7,019	7,010	7,019
pH _{4,5}	6,471	7,184	6,446	7,192	6,042	7,278	6,163	7,259
S.E.M.	0,066	0,020	0,034	0,005	0,046	0,007	0,048	0,009
H ⁺ -Äquivalente (nmol)								
	525,6	-276,5	570,6 ^{ns}	-290,1 ^{ns}	741,2	-457,2	689,8*	-418,6 ^{ns}
S.E.M.	51,6	36,6	19,9	8,5	11,4	14,5	14,3	17,9
N	5	6	6	6	5	5	5	4
ΔH^+	+249,1		+280,5		+284,0		+271,1	

Angebotsseite Lumen:

	Chlorid-Puffer		Gluconat-Puffer	
	Kontrolle	Amilorid	Kontrolle	Amilorid
Gewebsgehalt (%)	78,6	40,8 ^{ns}	115,4	36,1 ^{ns}
S.E.M.	8,3	18,8	15,2	10,4
N	5	5	5	5
Permeationsrate (%)	29,55	23,46 ^{ns}	32,82	28,34*
S.E.M.	2,49	2,27	1,52	0,93
N	5	5	5	5

Lumenseitig gegebenes Amilorid hat bei einer Inkubation der Mukosae in chloridhaltigem Medium keinen Einfluß auf den Mechanismus der luminalen Ansäuerung / blutseitigen Alkalisierung (Abb.36, Tab.49). Bei Stimulierung der luminalen Ansäuerung durch lumenseitig chloridfreie Inkubation mit einem Gluconat-Medium kommt es dagegen zu einer, wenn auch nur geringfügigen, statistisch schwach signifikanten Hemmung des Ansäuerungsmechanismus. Diese Inhibition unterdrückt den stimulierenden Effekt des Gluconat-Mediums jedoch nur zum Teil, so daß die erhaltenen pH-Wert Änderungen immer noch die der Vergleichsgruppe ohne Stimulation der Ansäuerung übertreffen. Auf die Alkalisierung des blutseitigen Mediums hat lumenseitig gegebenes Amilorid ohne Stimulierung der Ansäuerung keinen und nach Stimulierung der Ansäuerung durch chloridfreie Inkubation nur einen geringen, statistisch nicht belegbaren, hemmenden Einfluß (Abb.36,Tab.49).

In dieser Versuchsserie wurde PABA nur lumenseitig angeboten. Die Permeationrate verhielt sich entsprechend den Änderungen der pH-Werte. Dabei ist der hemmende Effekt von lumenseitig gegebenem Amilorid auf eine stimulierte lumenseitige Ansäuerung von einer als schwach signifikant belegbaren Hemmung der Resorptionsrate von PABA begleitet. Für den Gewebsgehalt lassen sich statistisch bei keiner Versuchsbedingung Änderungen belegen.

Unter Einfluß von lumenseitig gegebenem Omeprazol in einer Konzentration von 10 und 250 μM kommt es zu keiner Beeinflussung des Ansäuerungsmechanismus. Die pH-Werte des lumenseitigen Inkubationsmediums sind nach 45 minütiger Inkubation bei einem AusgangspH-Wert von 7,014 und bei einer Inkubation ohne Inhibitor mit 6,638 $\pm$ 0,035, N=6, bei 10 μM Omeprazol mit 6,630 $\pm$ 0,025, N=5, und bei 250 μM Omeprazol mit 6,624 $\pm$ 0,017, N=5, identisch.

7.2.13 Inkubation unter Einfluß der Salicylsäure

Salicylsäure ist ein Substrat einer Netto-Resorption an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Colons. In einer Versuchsserie sollte daher abgeklärt werden, in welcher Weise Salicylat die Permeation von PABA und den Mechanismus der lumenseitigen Ansäuerung beeinflussen kann. Salicylsäure wurde dabei zusammen mit 10 μ M PABA in einer Konzentration von 1 und 10 mM, d.h. im 100- oder 1000-fachen Überschuß eingesetzt.

Die Sekretion saurer Äquivalente kann über eine lumenseitige Gabe von 1 und 10 mM Salicylat, wenn auch im Fall des 1 mM Inhibitors nicht statistisch signifikant, eingeschränkt werden (Tab.50-Tab.51). Nach blutseitiger Gabe des Inhibitors kommt es im Gegensatz dazu nur bei einer Konzentration von 10 mM zu einer Hemmung der Ansäuerung. Eine blutseitige Alkalisierung ist bei 10 mM lumen- oder blutseitig gegebenem Salicylat nicht zu beobachten.

Tab. 50: Einfluß von 1 mM lumen- oder blutseitig gegebener Salicylsäure auf pH-Wert Änderungen der Inkubationslösungen und die Permeation von 10 μ M PABA; Statistischer Vergleich gegen die Kontrolle

	Kontrolle		Salicylsäure, 1 mM lumenseitig		Salicylsäure, 1 mM blutseitig	
	Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
pH ₀	7,065	7,065	7,060	7,060	7,060	7,060
pH ₄₅	6,638	7,192	6,718	7,166	6,595	7,200
S.E.M.	0,042	0,012	0,045	0,026	0,057	0,025
H ⁺ -Äquivalente (nmol)						
	+521,0	-223,4	+440,7 ^{ns}	-155,8 ^{ns}	+578,9 ^{ns}	-247,8 ^{ns}
S.E.M.	35,8	24,1	46,4	47,1	45,5	48,4
N	6	6	3	3	3	3
Δ H ⁺	+297,6		+284,9		+331,1	
Angebotsseite	Lumen	Blut	Lumen			Blut
Gewebsgehalt (%)	72,5	128,7	60,9 ^{ns}			136,3 ^{ns}
S.E.M.	14,8	21,3	4,6			30,6
N	3	3	3			3
Permeationsrate (%)	22,16	1,22	15,33*			1,13 ^{ns}
S.E.M.	1,10	0,30	1,12			0,32
N	3	3	3			3

Tab. 51: Einfluß von 10 mM lumen- oder blutseitig gegebener Salicylsäure auf pH-Wert Änderungen der Inkubationslösungen und die Permeation von 10 μ M PABA; Statistischer Vergleich gegen die Kontrolle

	Kontrolle		Salicylsäure, 10mM lumenseitig		Salicylsäure, 10mM blutseitig	
	Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
pH ₀	7,065	7,065	7,149	7,077	7,077	7,149
pH ₄₅	6,638	7,192	7,067	7,001	6,890	7,082
S.E.M.	0,042	0,012	0,015	0,006	0,030	0,030
H ⁺ -Äquivalente (nmol)						
	+521,0	-223,4	+140,6***	+120,2***	+274,2***	+115,9***
S.E.M.	35,8	24,1	25,3	8,7	38,9	5,0
N	6	6	3	3	2	2
Δ H ⁺	+297,6		+260,8		+390,1	
Angebotsseite	Lumen	Blut	Lumen			Blut
Gewebsgehalt (%)	72,5	128,7	41,4 ns			126,1 ns
S.E.M.	14,8	21,3	9,1			12,4
N	3	3	3			2
Permeationsrate (%)	22,16	1,22	6,50***			4,93***
S.E.M.	1,10	0,30	0,35			1,01
N	3	3	3			2

Der pH-Wert des blutseitigen Mediums ist statistisch hochsignifikant zu einem acideren pH-Wert als zu Versuchsbeginn verschoben (Tab.51). Erschwert wird die Beurteilung der Ergebnisse durch den pH-Wert des Versuchspuffers mit 10 mM Salicylat von 7,15. Wie andere Versuche mit verschiedenen pH-Werten des Inkubationsmediums zeigen, vermag die Mukosa eine blutseitige Inkubationslösung mit einem pH-Wert von 7,2 nicht weiter zu alkalisieren. Eine Ansäuerung des blutseitigen Inkubates von 7,15 auf 7,08 läßt sich jedoch nur über den Einfluß der Salicylsäure erklären.

Die Permeationsraten des PABA nach lumenseitigem Angebot entsprechen auch in diesem Falle dem pH-Wert des lumenseitigen Mediums (Tab.50-51). Dieser Befund wird besonders bei Einsatz von 10 mM Salicylat in einer hochsignifikanten Reduktion der Permeationsrate des PABA deutlich (Tab.51). Der sekretorische Fluß des Substrates ist bei 10 mM blutseitig zugegebener Salicylsäure hochsignifikant erhöht. Die Permeabilität des Gewebes ist in diesem Fall für den

Marker PEG900 ebenfalls von 0,46 % auf 1,85 % erheblich heraufgesetzt. Die erhöhte shunt-Permeabilität reicht als Erklärung der gesteigerten Substrat-Permeation aus.

Im Gewebsgehalt am Versuchsende ergibt sich für die Inkubate beider Angebotsseiten keine statistisch absicherbare Abhängigkeit zwischen der Gabe von Salicylat und der Aufnahme von Tracer in das Gewebe. Eine deutliche, wenn auch nicht statistisch belegbare, Differenz ergab sich nur bei lumenseitigem Angebot und unter Einfluß von 10 mM lumenseitig gegebener Salicylsäure mit einem Gewebsgehalt von rund zwei Dritteln relativ zu den mitgeführten Kontrollen.

7.3. Versuche zum In- und Efflux von PABA

7.3.1. Methodische Vorversuche: Zeitabhängigkeit der Aufnahme

Versuche mit sehr kurzen Inkubationszeiten ermöglichen die Messung der unidirektionalen Aufnahme eines Substrates in die Mukosa. Im Verlauf dieser Inkubation sollte die Konzentration der Verbindung im Gewebe, wie in den Inkubaten der Gegenseite, so gering sein, daß ein Rückfluß zur Angebotsseite zu vernachlässigen ist. Die Inkubationsdauer darf jedoch auch nicht zu kurz sein, da sonst die aufgenommene Menge zu gering für eine quantitative Analyse wird. Als weiteres Argument gegen eine zu kurze Inkubationszeit spricht der dabei überproportional wachsende Einfluß der unstirred water layer (UWL) auf die Aufnahme des Substrates.

Da die Inkubationszeit den entscheidenden Faktor im Influxversuch darstellt, wurde in einer Reihe von Vorversuchen der optimale Zeitraum im Kurzzeitexperiment für das Substrat PABA ermittelt. Aufgrund der sehr viel höheren Permeationsrate in resorptiver Richtung wurde der Durchtritt des Substrates nach lumenseitigem Angebot in einem Zeitraum von einer bis zehn Minuten untersucht. Mit in die Untersuchung einbezogen wurde die Änderung der pH-Werte beider Inkubationslösungen.

Wie zu erwarten, steigt die permeierte Menge an Substrat mit der Inkubationszeit (Abb.37). Diese Beziehung scheint jedoch nicht linear zu sein, im Bereich der kürzeren Inkubation permeiert dabei zuwenig Substrat. Bei einer Inkubation von 1 min kann der auf der Gegenseite aufzufindende Anteil des PABA mit 0,07 % vernachlässigt werden. Die auf den Anteil an extrazellulärer Säure korrigierte Menge an intrazellulär aufgenommenem Substrat wird, aus Gründen der Vergleichbarkeit, in μl -Äquivalenten der Menge an PABA in der Angebotslösung angegeben. Die Aufnahme des Substrates in die Mukosa erscheint trotz einer relativ großen Schwankung der Einzelwerte zwischen 1 und 10 min linear (Abb.37). Extrapoliert man den Kurvenverlauf auf seinen Schnittpunkt mit der Ordinate, so ergibt sich eine von Null zu unterscheidende Aufnahme vor Inkubationsbe-

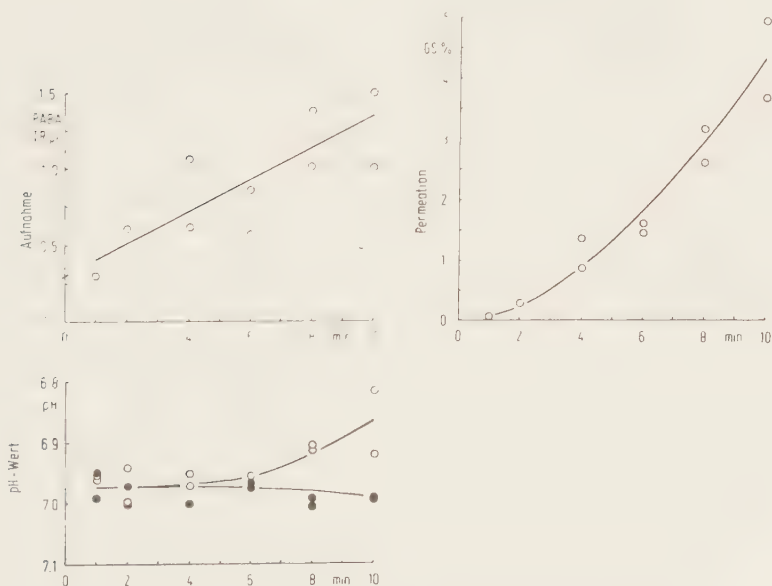


Abb.37 : Intrazelluläre Aufnahme (oben links, $\text{PABA IR}_{\mu\text{l}} = 0,29 + 0,106 \cdot t$, $r=0,852$) und Permeationsrate (GS% rechts, in Prozent des Angebotes) von $10 \mu\text{M}$ PABA nach lumenseitigem Angebot und Änderungen des pH-Wertes der Inkubationsmedien (unten links, Blutseite: gefüllte, Lumenseite: offene Symbole) in einem Zeitraum von 1-10 min am Meerschweinchen-Colon; jeder Wert entspricht einem Versuch

ginn bei t_0 , d.h. im Zeitraum zwischen Inkubationsbeginn und einer Minute entspricht die Aufnahme nicht der berechneten linearen Beziehung. Eine Ansäuerung des lumenseitigen und Alkalisierung des blutseitigen Inkubationsmediums läßt sich erst ab 8 min nach Inkubationsbeginn belegen (Abb.37).

PABA wird in der Kurzzeitinkubation wesentlich schneller über die basolaterale Membran als über die apikale Membran aufgenommen. Dies eröffnete die Möglichkeit, die Aufnahme von 10 μM und 50 mM PABA über die blutseitige Membran in einem Zeitraum von weniger als einer Minute zu untersuchen. Ebenfalls untersucht wurde dabei die Markierung des extrazellulären Raumes (ER) mit der Markersubstanz PEG900. Obwohl durch den Spülvorgang am Ende der Inkubation ein Teil dieses Markers ausgewaschen wurde, erweist sich der an der Mukosa verbleibende Anteil als zur Inkubationszeit proportional (Abb.38). Dieser Befund spricht damit für eine gute Reproduzierbarkeit des mit eiskaltem Tris-Medium durchgeführten Spülvorgangs. Ein von der Substratkonzentration abhängender Effekt auf den extrazellulären Raum kann nicht eindeutig beobachtet werden.

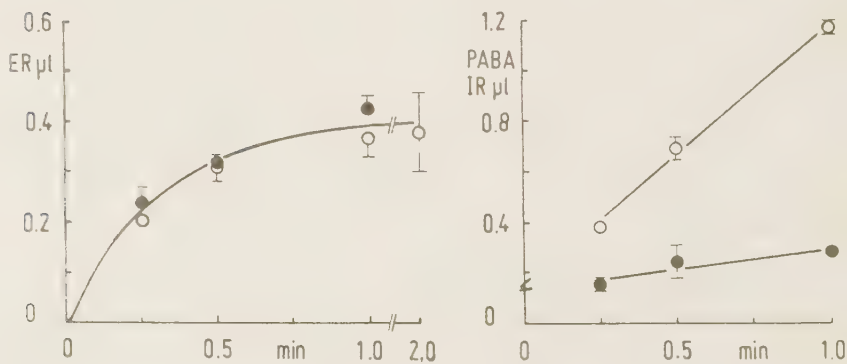


Abb.38 : Größe des anmarkierten extrazellulären Raumes in μl (linke Bildhälfte, ER) und intrazelluläre Aufnahme (rechte Bildhälfte, PABA IR μl) von 10 μM (offene Symbole, $\mu\text{l IR} = 0,15 + 1,03 \cdot t$, $r = 0,988$) und 50 mM (geschlossene Symbole $\mu\text{l IR} = 0,14 + 0,15 \cdot t$, $r = 0,80$) PABA nach blutseitigem Angebot zwischen 0,25 und 1 min; jeder Wert repräsentiert drei Versuche

Die Anmarkierung des ER zeigt eine Sättigung bei einer Minute (Abb.38). Wie sich aus weiteren Experimenten hervorgeht, die hier aus Platzgründen im einzelnen nicht dargestellt werden, kommt es bei einer längeren Inkubationsdauer zu keiner weiteren Steigerung des ER. Die Halbwertszeit der Anmarkierung des extrazellulären Raumes mit PEG900 beträgt, bei einem maximalen Volumen des ER von 0,4 μ l, 15 s (Abb.38). Aus diesem Wert und dem Diffusionskoeffizienten von PEG900 läßt sich nach einem Verfahren von Thomson und Dietschy (1984) eine effektive Dicke der basolateralen unstirred-water layer unseres Präparates von 43,6 μ m errechnen.

Die Aufnahme von PABA ist zwischen 0,25 und einer Minute linear. Extrapoliert man den Kurvenverlauf wieder auf den Zeitpunkt zu Beginn der Inkubation, so ergibt sich eine hypothetische Aufnahme vor Beginn der Inkubation von 0,15 μ l (Abb.38). Diese schnelle Aufnahme zwischen 0 und 0,25 min ist, unabhängig von der angebotenen Konzentration des PABA, für 10 μ M und 50 mM im relativen Wert gleich groß.

Die, auf der Grundlage der Vorversuche, gewählte Inkubationszeit sollte für Versuche mit lumen- und blutseitigem Substratangebot gleich sein. Aus diesem Grunde konnte keine Inkubationsdauer unter einer Minute gewählt werden, da sonst die über die apikale Membran aufgenommene Menge zu gering für eine Analyse war. Andererseits finden sich bei einer Permeationsdauer von 4 min nach lumenseitigem Angebot im Mittel mehr als ein Prozent des Tracers auf der Blutseite. Gegen eine längere Inkubationszeit sprechen ebenfalls die nach 8 min auftretenden Änderungen des pH-Wertes der Inkubationslösungen. Zusammenfassend erscheint eine Inkubationsdauer von einer Minute im Versuchsansatz als optimal.

Gegen eine Inkubation von einer Minute spricht die basolateral wie luminale schnelle Aufnahme von Substrat bei Inkubationsbeginn. Eine Erklärung dieses Befundes könnte in einer von der intrazellulären Aufnahme verschiedenen, unspezifischen extrazellulären Bindung des Substrates an die Mukosa liegen.

7.3.2 Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme von PABA

PABA wurde in einer Konzentration von 0,01 bis 50 mM lumen- oder blutseitig in einem Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer, pH 7,00, angeboten. Die Aufnahme des Substrates ist in keiner der untersuchten Konzentrationen mit dem Feuchtgewicht der Mukosae, sondern ausschließlich mit der Oberfläche des Gewebes korreliert. Die aufgenommene Menge an Substrat, welche dem unidirektionellen Influx entspricht, wird in nmol per cm² und min angegeben (Tab.52).

Vergleicht man die lumen- und die blutseitige Aufnahme von PABA (Tab.52), so wird das Substrat wesentlich schneller über die baso-

Tab.52: Aufnahme von PABA nach einseitigem Angebot in einer Minute in nmol per cm² und min bei einem Angebot von 0,01 bis 50 mM; für die blutseitige Aufnahme ist zusätzlich die Abweichung von der errechneten Aufnahmefunktion (Tab.43) in Prozent angegeben

Angebotskonzentration (mM):		0,01	0,1	0,3	1	2
Angebotsseite: Lumen						
(nmol/cm ² min)		0,0179	0,204	0,473	1,258	2,423
S.E.M.		0,0025	0,042	0,033	0,138	0,048
N		8	3	3	3	3
Angebotsseite: Blut						
(nmol/cm ² min)		0,062	0,533		4,620	7,164
S.E.M.		0,001	0,032		0,425	0,352
N		25	3		2	7
Abweichung	(%)	66,5	43,7		29,6	4,7
Angebotskonzentration: (mM)		3	10	20	30	50
Angebotsseite: Lumen						
(nmol/cm ² min)				12,067	11,550	28,179
S.E.M.				0,706	0,600	3,785
N				3	2	7
Angebotsseite: Blut						
(nmol/cm ² min)		12,195	25,342	42,525	55,750	74,182
S.E.M.		0,015	1,488	1,894	3,438	3,894
N		2	6	4	3	11
Abweichung	(%)	23,5	- 3,9	0,2	2,1	0,1

laterale Membran aufgenommen. Die Aufnahme über beide Membranen ist bei steigender Konzentration des Angebotes nicht strikt linear, sondern läßt sich als Summe einer passiven Diffusion und eines vermittelten Transportes beschreiben:

$$J(s) = \frac{v_{\max} * (S)}{K_m + (S)} + P * (S)$$

wobei $v_{\max}$ der maximalen Kapazität, K_m der Halbsättigungskonstante des vermittelten Transportes und P der Permeabilitätskonstante des passiven Anteils entspricht. Diese Parameter (Tab.53) wurden in einem iterativen Prozeß nach der Methode der kleinsten Quadrate ermittelt (Roos und Pfleger, 1972).

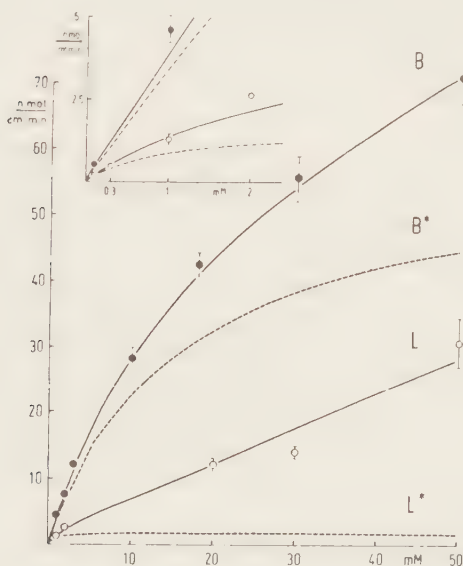


Abb.39 : Influx von 0,01 bis 50 mM PABA in die isolierte Mukosa des Meer-schweinchen-Colons nach lumen- (offene Symbole) oder blutseitigem Angebot (geschlossene Symbole). Die geschlossenen Linien (L,B) repräsentieren den Transport- und den Diffusionsanteil der Aufnahme, die durchbrochene Linie (L*B*) den Transportanteil der Aufnahme Parameter s. Tab. 53, Anzahl der Versuche je Wert s.Tab.52

Tab.53 : Kinetische Parameter der Aufnahme von PABA über die lumen- und blutseitige Membran des Meerschweinchen-Colons

Angebots- seite	V_{max} nmol/ cm ² min	K_m mM	P 10 ⁻⁴ cm/min
Lumen	1,6	0,94	5,3
Blut	55,3	18,1	6,7

Für die passiven Permeabilitäten läßt sich für die luminale und contraluminale Membran mit 5,3 und 6,7 * 10⁻⁴ cm pro min ein in etwa gleicher Wert bestimmen. Die höhere Aufnahme rate über die basolaterale Membran ergibt sich damit aus den Unterschieden in den sättigungsfähigen Anteilen der Aufnahme (Tab.53,Abb.39).

7.3.3 Hemmung der Aufnahme von PABA

Ein über Carrier vermitteltes Transportsystem kann mit chemisch verwandten Verbindungen kompetitiv gehemmt werden. Dabei ist von besonderer Bedeutung, welche Modifikation im Molekül des Hemmstoffes seine Wirkung auf den Transport aufzuheben vermag. Die dabei untersuchten Inhibitoren wurden in den Versuchen in einer Konzentration von 10 und 30 mM eingesetzt. Dies entspricht dem 1000 und 3000-fachen der eingesetzten PABA-Konzentration von 10 µM. Als Hemmstoffe wurden aromatische organische Carbonsäuren, aliphatische organische Säuren, das Glukuronid und das Sulfat des p-Nitrophenols, eine organische Sulfonsäure und eine organische Base gewählt. Als weitere Inkubationsbedingung wurde in zwei Versuchsansätzen die Aufnahme von PABA aus einem chloridfreien Medium untersucht (Abb.40,Tab.54).

Eine blutseitig chloridfreie Inkubation bewirkt eine statistisch schwach signifikante Stimulation der Aufnahme von PABA. Dabei spielt die Wahl des Ersatz-Anions -Gluconat oder Sulfat- für das Ausmaß dieser Steigerung um 24 % des Kontrollwertes keine Rolle.

Die Aufnahme von PABA kann durch alle eingesetzten aromatischen Carbonsäuren gehemmt werden. N-Acetyl-PABA hemmt die Aufnahme in einer Konzentration von 10 mM schwach signifikant. Das als weiteres Analogon zu PABA eingesetzte PAH hemmt in einer Konzentration von 30 mM die Aufnahme signifikant. Salicylsäure (10 mM) und Benzoesäure (30 mM) führen ebenfalls zu einer hochsignifikanten Hemmung des Transportes.

Von den Konjugaten des p-Nitrophenols führt nur die Carbonsäure p-Nitrophenylglukuronid zu einer Hemmung der Aufnahme. Die Hemmwirkung dieser Substanz ist konzentrationsabhängig am größten in der höchsten eingesetzten Konzentration von 30 mM. Das Sulfat des p-Nitrophenols hat dagegen bei einer Konzentration von 10 und 30 mM keinen Einfluß auf den Transport von PABA. Aliphatische Carbonsäuren führen ebenfalls zu einer statistisch signifikanten Hemmung der Aufnahme. Bei den kurz- und mittelkettigen Carbonsäuren Essigsäure und Octansäure nimmt die Hemmwirkung mit

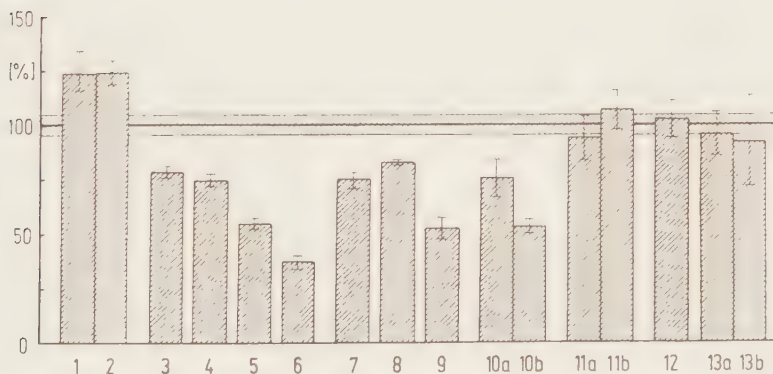


Abb. 40 : Hemmung der unidirektionalen Aufnahme von PABA über die blutseitige Membran in Prozent der mitgeführten Kontrollen
 Chloridfreier Inkubationspuffer ((1) Gluconatmedium, (2) Sulfatmedium), 10 mM Ac-PABA (3), 30 mM PAH (4), 10 mM Salicylsäure (5), 30 mM Benzoesäure (6), 30 mM Essigsäure (7), 30 mM Octansäure (8), 30 mM L-Milchsäure (9), 10 und 30 mM Nitrophenylglukuronid (10a,b), 10 und 30 mM Nitrophenylsulfat (11a,b), 10 mM β -Naphtholorange (12) und 10 und 30 mM N-Methylscopolamin (13a,b); Anzahl Versuche je Säule s.Tab.54

Tab.54 : Hemmung der unidirektionalen Aufnahme von 10 μ M PABA über die baso-laterale Membran am Meerschweinchen-Colon, Kontrolle entspricht 100% Statistischer Vergleich gegen Kontrolle

Inhibitor		N	Aufnahme (μ mol / min cm^2)	Inhibition % Kontrolle
Kontrolle		11	65,6 +/- 2,8	100
Chloridfreie Inkubation:				
Gluconat-Medium		3	81,4 +/- 6,4 *	124,0 +/- 9,8
Sulfat-Medium		3	81,7 +/- 3,6 *	124,5 +/- 5,5
Ac-PABA	10 mM	3	51,8 +/- 1,3 *	78,9 +/- 2,0
PAH	30 mM	5	49,2 +/- 1,8 **	75,0 +/- 2,7
Salicylsäure	10 mM	3	36,0 +/- 1,5 ***	54,8 +/- 2,3
Benzoesäure	30 mM	3	24,5 +/- 2,0 ***	37,3 +/- 3,1
PNP-Glukuronid	10 mM	4	49,9 +/- 5,6 *	76,0 +/- 8,5
	30 mM	3	35,0 +/- 2,0 ***	53,3 +/- 3,1
PNP-Sulfat	10 mM	4	62,0 +/- 6,4 ^{ns}	94,5 +/- 9,8
	30 mM	3	70,6 +/- 6,0 ^{ns}	107,6 +/- 9,1
Essigsäure	30 mM	5	49,5 +/- 2,1 **	75,4 +/- 3,2
Octansäure	30 mM	5	54,5 +/- 0,7 **	83,0 +/- 1,1
L+-Milchsäure	30 mM	3	34,4 +/- 2,0 ***	52,4 +/- 4,0
β -Naphtholorange	10 mM	3	67,6 +/- 5,6 ^{ns}	103,0 +/- 8,5
Methylscopolamin	10 mM	3	63,1 +/- 6,6 ^{ns}	96,1 +/-10,1
	30 mM	4	60,9 +/-14,0 ^{ns}	92,8 +/-21,3

steigender Kettenlänge ab. Deutlich effektiver als diese Verbindungen hemmt die Hydroxycarbonsäure L+-Lactat. Keine Hemmwirkung kann mit der Sulfonsäure β -Naphtholorange und mit der organischen Base N-Methylscopolamin erzielt werden.

7.3.4 Efflux von PABA

In einer Versuchsserie wurde der Efflux aus mit 100 μ M lumen- oder blutseitig über einen Zeitraum von 45min vorbeladenen Mukosae des Meerschweinchen-Colons untersucht. In vergleichbaren Versuchen am

Jejunum bestand ein Problem in den aus der Vorinkubation verschleppten Quantitäten an Tracer und dessen "Efflux", der erheblich mit dem der Mukosa interferierte. Aus diesem Grund wurde am Colon das gesamte Kammermaterial (Kammer und eine Folie) zwischen Vorbeladung und Effluxversuch ausgewechselt und die auf die PVC-Folie geklebte Mukosa kurz in eiskaltem Krebs-Tris Puffer gespült.

Im Ergebnis waren die neu eingeführten Maßnahmen erfolgreich: Die aus dem Gewebe insgesamt in das Effluxmedium austretende Radioaktivität entspricht in diesem Versuchsansatz $4,22 \pm 1,11 \mu\text{l}$, $N=3$, der Angebotslösung nach lumen- und $6,32 \pm 1,39 \mu\text{l}$, $N=3$, nach blutseitiger Vorbeladung. Im Vergleich hierzu läßt sich bei einer identischen Inkubationsbedingung $2,80 \mu\text{l}$ (lumenseitiges Angebot)

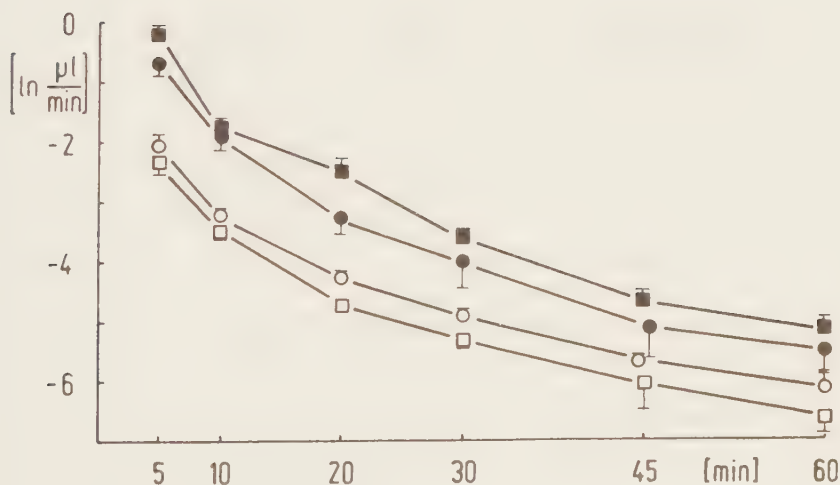


Abb. 41 : Halblogarithmische Auftragung der Effluxgeschwindigkeit von Tracer aus lumen- (●) oder blutseitig (■) mit $100 \mu\text{M}$ ^{14}C -PABA 45min vorbeladenen Mukosae zur Lumen- (offene Symbole) oder Blutseite (geschlossene Symbole), jedes Symbol repräsentiert das Mittel aus drei Werten

und 4,50 μ l (blutseitiges Angebot) Substrat in der Mukosa direkt bestimmen. Die dabei sichtbare Differenz von ca 2 μ l im Efflux-experiment ist damit wesentlich geringer als die in den Versuchen am Jejunum aufgetretenen Differenzen mit bis zu 50 μ l der Angebotslösung.

Unabhängig von der Vorbeladungsseite tritt der überwiegende Anteil an Tracer in das blutseitige Inkubationsmedium aus. Dabei werden insgesamt 79,3 $\pm$ 3,55 %, N=3, nach lumenseitiger Vorbeladung und 87,2 $\pm$ 2,41 % N=3, nach blutseitiger Vorbeladung zur Blutseite abgegeben. Auf der Lumenseite erscheinen entsprechend 20,7 $\pm$ 3,56 %, N=3, nach lumen- und 12,76 $\pm$ 2,41 % nach blutseitiger Vorbeladung. Damit existiert für die Abgabe eine gewisse Differenz in Abhängigkeit von der Seite des Angebotes, die sich, wie aus Abb.41 ersichtlich, auch aus einem unterschiedlichem Efflux aus den Kompartimenten des Gewebes mit einer größeren Halbwertszeit ergibt. Damit läßt sich, unabhängig von der überwiegenden Abgabe des Tracers zur Blutseite, in diesem Versuchsansatz auch ein Korrelat des lumenseitigen Metabolisierungsraumes belegen.

7.4. Vergleichende Untersuchung zur Permeation anderer Säuren am Meerschweinchen-Colon

7.4.1 Permeation des Ac-PABA

Die Untersuchung der Permeation des Metaboliten Ac-PABA am Colon ergibt sich auf der gleichen Grundlage wie diese Studien am Jejunum: Bei einer Steigerung der Angebotskonzentration von PABA verschiebt sich durch die Sättigung der Acetylierung die Verteilung des Tracers sowohl im Enterocyten wie auch in den Inkubaten zugunsten der Ausgangssubstanz; diese Verschiebung ist jedoch auch am Colon nicht von einer adequate Änderung der Summe des zur Gegenseite übergetretenen Tracers begleitet. PABA und Ac-PABA weisen also auch in diesem Fall im Abgabeschritt aus dem Gewebe ähnliche Permeabilitäten auf. Die Permeabilität im Aufnahmeschritt des Metaboliten wurde in einer Versuchsserie bei einer Angebotskonzentration

tration von 0,01, 0,1 und 2 mM Ac-PABA in einem Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer unter Sauerstoffbegasung untersucht. In Vorversuchen zur Metabolisierung des Ac-PABA konnte weder eine Desacetylierung noch eine andere Metabolisierungsreaktion beobachtet werden.

N-Acetyl-PABA permeiert das Meerschweinchen-Colon bevorzugt in resorptiver Richtung (Abb.42). Dabei ist diese Permeation in allen untersuchten Konzentrationen signifikant höher als in sekretorischer Richtung. Beide Permeationsraten -sowohl die nach lumen-seitigem wie die nach blutseitigem Angebot- zeigen ein Maximum bei einer Angebotskonzentration von 100 μ M Ac-PABA (Abb.42,Tab.55). Dieses Maximum läßt sich jedoch nur nach blutseitigem Substratangebot statistisch als schwach signifikant belegen. Im Vergleich mit der Permeation von PABA ist vor allem die Permeationsrate in

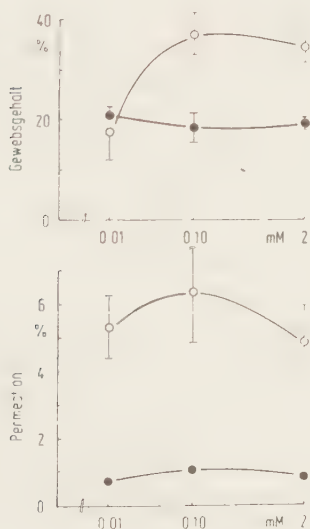


Abb. 42: Konzentrationsabhängigkeit von Gewebsgehalt (oben) und Permeationsrate (unten) von 0,01 bis 2 mM N-Acetyl-PABA nach lumen- (offene Symbole) oder blutseitigem (geschlossene Symbole) Angebot am Meerschweinchen-Colon; jeder Wert entspricht 3 bis 10 Versuchen.

Tab.55 : Gewebsgehalt und Permeationsraten nach 45 minütiger Inkubation lumen- oder blutseitig gegebenem Ac-PABA am Meerschweinchen-Colon Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer, pH=7,00, O₂: 37°C; Statist. Vergleich (*-***). Angebotsseite.Lumen gegen Blut (o-ooo) gegen nächst niedere Konzentration gleicher Angebotsseite.

Konzentration (mM)	0,01		0,10		2,00	
	Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
Angebotsseite						
Gewebsgehalt (%)	17,79 ^{ns}	20,91	37,26 *	18,45	31,21 *	19,35
S.E.M.	5,63	1,47	4,13 ^{ns}	2,88 ^{ns}	3,28 ^{ns}	0,98 ^{ns}
N	9	10	4	3	3	4
Permeation (%)	5,326***	0,711	6,395*	1,068	4,837*	0,835
S.E.M.	0,960	0,061	1,519 ^{ns}	0,071 ^o	1,143 ^{ns}	0,025 ^o
	10	9	6	4	6	6

resorptiver Richtung deutlich geringer (Abb.42,Tab.55). Setzt man die Permeationsrate von PABA als 100 %, so entsprechen die Permeationsraten von Ac-PABA bei lumenseitigem Angebot 20-24 %, bei blutseitigem Angebot 40-58 % der Permeation des PABA.

Der Gewebsgehalt an Ac-PABA ist bei der Angebotskonzentration von 0,10 und 2 mM nach lumenseitigem Angebot signifikant höher als nach blutseitiger Gabe. Bei einer Konzentration von 0,01 mM sind dagegen die Gewebsgehalte nach lumen- oder blutseitiger Gabe ungefähr gleich. Insgesamt ist die Konzentration des Substrates im Gewebe für Ac-PABA geringer als für PABA.

7.4.2 Permeation der Salicylsäure

Salicylsäure hat an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Jejunums eine dem PABA vergleichbare Permeationsrate und permeiert, wie dieses Substrat, bevorzugt in sekretorischer Richtung. Am Meerschweinchen-Colon soll Salicylat dagegen unabhängig von der Angebotsseite mit einer gleichen Permeationsrate in beiden Richtungen übertreten (Lauterbach, 1983).

Als Inkubationspuffer wurde in den Versuchen von Lauterbach und Steinke (1981) ein Hepes-Puffer mit einem pH-Wert von 7,25 eingesetzt. Wie eigene Versuche zur Änderung der pH-Werte der

Inkubationslösungen am Meerschweinchen-Colon ergeben, ist dieser Puffer gegenüber pH-Wert Änderungen wesentlich stabiler als das in den Versuchen dieser Studie bevorzugt eingesetzte Tris-Medium. Nach 45 min Inkubation mit dem Hepes-Puffer verändert sich der pH-Wert der lumenseitigen Inkubationslösung von 7,26 auf 7,20, während sich der pH-Wert der blutseitigen Inkubationslösung von 7,26 auf 7,32 verschob. Im Vergleich wurde mit dem Tris-Medium im Mittel bei einem Ausgangs-pH von 7,01 ein pH-Wert der Lumenseite von 6,53 und der Blutseite von 7,16 erreicht. In einer Versuchsreihe wurde daher die Permeation von 0,01 bis 20 mM Salicylsäure unter Einfluß des Tris-Mediums und seiner Puffer-Eigenschaften untersucht.

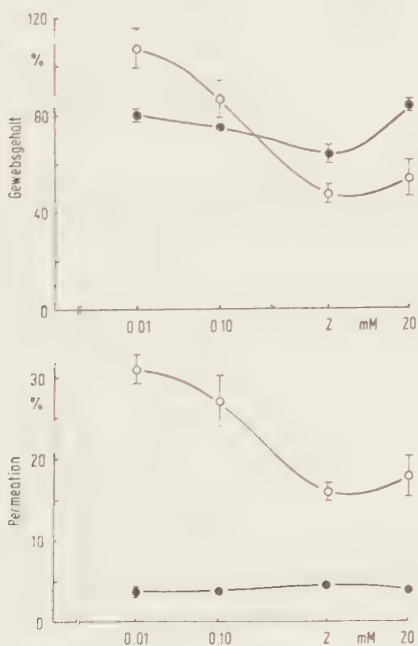


Abb. 43: Konzentrationsabhängigkeit von Gewebsgehalt (oben) und Permeationsrate (unten) von 0,01 bis 20 mM Salicylsäure nach lumen- (offene Symbole) oder blutseitigem (geschlossene Symbole) Angebot am Meerschweinchen-Colon; jeder Wert entspricht 2 bis 4 Versuchen

Tab.56 : Gewebsgehalt und Permeationsraten nach 45 minütiger Inkubation lumen- oder blutseitig gegebener Salicylsäure am Meerschweinchen-Colon, Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer, pH=7,00, O₂, 37°C; Statist. Vergleich (*-***). Angebotsseite Lumen gegen Blut (o-ooo) gegen nächst niedere Konzentration gleicher Angebotsseite.

Konzentration (mM)	0,01	0,10	2,00	20,00
Angebotsseite Lumen:				
Gewebsgehalt (%)	107,52*	86,27 ^{ns}	46,82 ^{ns}	50,34*
S.E.M.	8,36	7,43 ^{ns}	3,87 ^o	7,89 ^{ns}
N	3	3	2	3
Permeation (%)	31,13***	27,17***	15,98***	17,86**
S.E.M.	1,78	3,23 ^{ns}	1,07 ^o	2,56 ^{ns}
N	3	3	2	3
Angebotsseite Blut:				
Gewebsgehalt (%)	80,27	74,82 ^{ns}	63,81 ^o	83,73 ^o
S.E.M.	2,67	0,90	4,09	2,53
N	3	3	4	3
Permeation (%)	3,765	3,681 ^{ns}	4,530 ^{ns}	3,919 ^{ns}
S.E.M.	0,691	0,338	0,411	0,439
N	2	2	4	3

Salicylsäure hat in allen untersuchten Konzentrationen eine signifikant höhere Permeationsrate nach lumenseitigem als nach blutseitigem Angebot (Abb.43,Tab.56). Dabei ist die Resorptionsrate in ihrer Größenordnung der des PABA vergleichbar. Nach blutseitigem Angebot ist dagegen die Permeation des Salicylates mehr als doppelt so groß wie die der p-Aminobenzoesäure (Tab.56). Im Verlauf einer Steigerung der angebotenen Substratkonzentration kommt es nach blutseitigem Angebot zu keiner Veränderung des sekretorischen Flusses. Die resorbierte Menge an Salicylsäure nach lumenseitigem Angebot wird bei einer Steigerung der Konzentration von 0,10 auf 2 mM statistisch schwach signifikant geringer. Diese Differenz spiegelt eine kontinuierliche Abnahme der Resorptionsquote mit steigender Angebotskonzentration des Substrates zwischen den Konzentrationen von 0,01, 0,10 mM und 2 mM wieder (Abb.43,Tab.56).

Der am Versuchsende bestimmte Gewebsgehalt nach lumenseitigem Angebot verändert sich parallel zur Resorptionsquote (Abb.43, Tab.56). Wie die Permeationsrate nimmt der Gewebsgehalt bei einer Steigerung der Angebotskonzentration von 0,01 auf 2 mM kontinu-

ierlich ab, um bei der Konzentration von 20 mM wiederum leicht anzusteigen. Die Abhängigkeit zwischen Gewebsgehalt und Resorption legt nahe, daß der Aufnahmeschritt der Salicylsäure die für die Permeationsrate entscheidende Komponente darstellt.

Um die Möglichkeit einer direkten Wechselwirkung der organischen Säure Hepes mit dem Transportsystem auszuschließen, wurde in einem Versuchsansatz 10 μ M Salicylsäure in einem Krebs-Hepes-Glukose-Mannit Puffer, pH 7,26, eingesetzt. Auch hier kann mit 9,35 $\pm$ 0,93 %, N=8, eine, statisch hochsignifikante, höhere Permeation in resorptiver als mit 5,39 $\pm$ 0,34 %, N=8, in der sekretorischen Richtung bestimmt werden. Als intrazelluläre Konzentration finden sich 17,26 $\pm$ 4,52 %, N=8 nach lumenseitigem und 43,14 $\pm$ 2,65 %, N=8, nach blutseitigem Angebot

7.4.3. Permeation der Sulfanilsäure

Sulfanilsäure wird, wie PABA, Ac-PABA, β -Naphtholorange und Salicylsäure, vom Meerschweinchen-Jejunum sezerniert (Sund und Lauterbach, 1978). Deshalb erschien es interessant, die Permeation dieser Verbindung auch am Meerschweinchen-Colon zu untersuchen. Sulfanilsäure wurde dabei in einer Konzentration von 0,01, 2 und 20 mM in einem Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer, pH 7,00, eingesetzt.

Die Regressionsanalyse der Permeationsraten der Sulfanilsäure gegen die PEG-Permeation ergibt keinen Hinweis auf eine bevorzugte Permeationsrichtung (Abb.44). Unabhängig von Angebotsseite und Konzentration ordnen sich alle Wertepaare um eine Regressionsgerade, die die Ordinate in Nähe des Nullpunktes schneidet. Damit permeiert die Sulfanilsäure das Colon ausschließlich über den parazellulären Weg.

Die sehr geringen Gewebsgehalte der Sulfanilsäure am Versuchsende unterstützen die Annahme einer ausschließlich parazellulären Permeation (Tab.57). Nur nach blutseitigem Angebot bei einer Konzen-

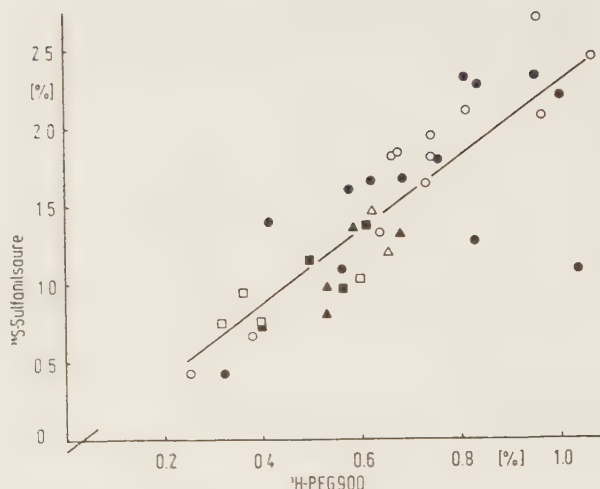


Abb. 44: Regressionsanalyse der Permeation der Sulfanilsäure (Ordinate) gegen die Permeation von PEG900 (Abszisse). Sulfanilsäure wurde in einer Konzentration von 0,01 (Kreise) 2 (Quadrate) und 20 mM (Dreiecke) lumen- (offene Symbole) oder blutseitig (geschlossene Symbole) eingesetzt. Regressionsgerade $y = -0,08 + 2,34 x$; $r = 0,833$

Tab.57 : Konzentrationsabhängigkeit des Gewebsgehaltes und der Permeationsraten von 0,01 bis 20 mM Sulfanilsäure nach lumen- oder blutseitigem Angebot am Meerschweinchen-Colon, Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer, pH=7,00, O₂, 37°C; Statist.Vergleich (*-***). Angebotsseite Lumen gegen Blut

Konzentration (mM)		0,01		0,10		20	
Angebotsseite		Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
PABA							
Gewebsgehalt (%)		1,22 ns	5,14	-1,02 ns	1,16	0,70 ns	5,14
	S.E.M.	0,92	1,69	0,65	0,81	0,98	1,29
	N	16	16	4	4	3	4
Permeation (%)		1,735 ns	1,614	0,879 ns	1,058	1,332 ns	1,113
	S.E.M.	0,190	0,159	0,067	0,138	0,133	0,133
	N	12	13	4	4	2	4
Marker							
Permeation (%)		0,700 ns	0,696	0,328 ns	0,405	0,485 ns	0,438
	S.E.M.	0,074	0,057	0,049	0,036	0,016	0,026
	N	12	13	4	4	2	4

tration von 0,01 und 20 mM ließ sich überhaupt ein signifikant von Null zu unterscheidender Anteil im Gewebe feststellen. Allgemein scheint der Gewebsgehalt in der Tendenz in allen untersuchten Konzentrationen nach blutseitigem Angebot größer als nach lumenseitigem Angebot zu sein.

7.4.4 β -Naphtholorange

7.4.4.1 Parallele Sekretion von β -Naphtholorange und Resorption von PABA

β -Naphtholorange (β -NO) wird von der isolierten Mukosa des Meer-schweinchen-Colons bevorzugt in der sekretorischen Richtung transportiert (Lauterbach, 1983). Um gleichzeitig die Resorption des PABA und die Sekretion von β -NO in einer Präparation zu demonstrieren und damit auch eine Wechselwirkung zwischen beiden Abläufen auszuschließen, wurden in einem Versuch PABA und β -Naphtholorange zusammen in einer Inkubationslösung eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte für β -Naphtholorange über eine radioaktive Markie-

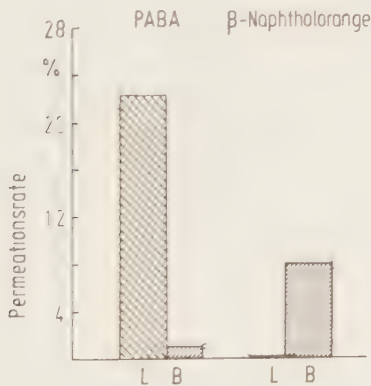


Abb.45 : Permeationsraten von 2 mM PABA und 10 μ M β -Naphtholorange nach gleichzeitigem lumen- (L) oder blutseitigem (B) Angebot am Meer-schweinchen-Colon

Tab.58 : Permeationsraten von 2 mM PABA und 10 μ M β -Naphtholorange bei gleichzeitigem (PABA und β -NO) oder nicht gleichzeitigem (PABA oder β -NO) Angebot in Prozent der eingesetzten Menge am Meer-schweinchen-Colon

		PABA		β -Naphtholorange	
Angebotsseite		Lumen	Blut	Lumen	Blut
Angebotslösung:					
PABA und β -NO		22,63	1,018	0,136	7,56
	SEM	1,28	0,065	0,013	0,35
	N	11	10	11	10
PABA oder β -NO		23,78	1,652	0,252	7,83
	SEM	2,48	0,239	0,061	1,05
	N	15	15	3	4

rung des Schwefel-Atoms. Da ^{35}S und ^{14}C sehr ähnliche Emmissions-spektren des Szintillators in der Szintillationszählung hervor-rufen, war der Einsatz von PABA als ^{14}C -markierte Verbindung in diesem Experiment nicht möglich. PABA wurde daher in den Inkuba-tionslösungen mit einer kolorimetrischen Methode nach Gharbo und Mitarbeitern (1985) bestimmt. Als Angebotskonzentration der p-Aminobenzoesäure wurde 2 mM gewählt.

Auch bei gleichzeitigem Angebot läßt sich für PABA eine Netto-Re-sorption und, für β -Naphtholorange, eine Netto-Sekretion statis-tisch hochsignifikant belegen. Vergleicht man die Resultate mit Ergebnissen aus Studien, in denen beide Verbindungen getrennt angeboten wurden, so ergibt sich dabei keine erkennbare Beein-flussung der Permeationsraten beider Substrate in der bevorzugten Permeationsrichtung. Die Unterschiede, die in den Permeationsraten der Gegenrichtung zwischen den Versuchen mit oder ohne Co-Admini-stration der Substrate auftreten, lassen sich zwanglos über eine unterschiedliche shunt-Permeabilität der in die Untersuchung ein-gegangenen Gewebstücke erklären.

7.4.4.2 Hemmung der Sekretion von β -Naphtholorange mit Phenoxybenzamin

Die Netto-Sekretion von β -Naphtholorange (β -NO) am Meerschweinchen-Jejunum kann über eine blutseitige Gabe von 0,11 mM Phenoxybenzamin (PBA) gehemmt werden. In einer Versuchsserie wurde der Einfluß von 0,11 mM PBA auf die Permeation von β -NO am Colon untersucht. Um eine befriedigende Hemmwirkung zu erreichen, wurde eine 2stündige Vorinkubation mit blutseitig gegebenem PBA notwendig. Um einen Einfluß dieser Vorinkubation (VK) selbst auszuschließen, wurden im Versuch auch Kammern ohne Vorinkubation mitgeführt.

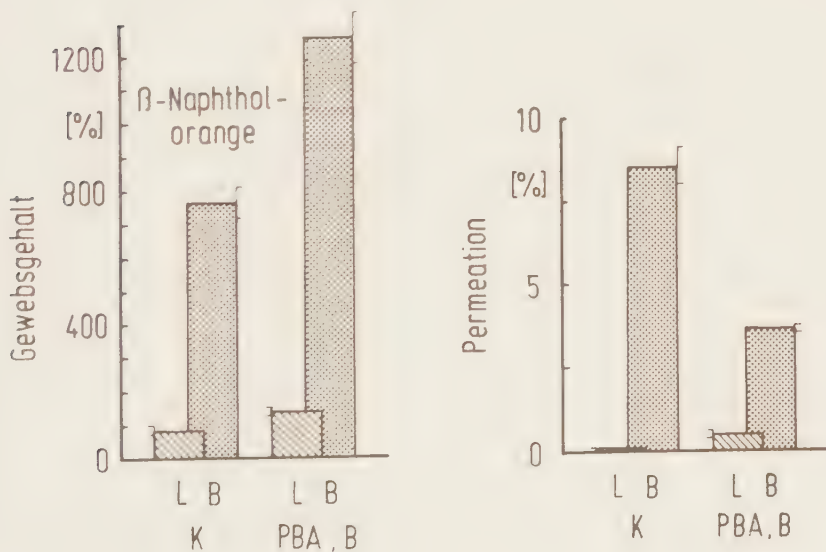


Abb. 10: Einfluß von 0,11 mM Phenoxybenzamin (PBA) auf Gewebsgehalte (linke Bildhälfte) und Permeationsraten (rechte Bildhälfte) von 10 μ M β -Naphtholorange. Kammern lumen- (L) oder blutseitig (B) angebotenem β -Naphtholorange. Kammern 2h mit PBA blutseitig vorinkubiert. Anzahl Versuche s.Tab.59

Tab.59 : Gewebsgehalt und Permeationsraten von 10 μ M β -Naphtholorange am Meerschweinchen-Colon nach zweistündiger Vorinkubation (VK) mit und ohne 110 μ M blutseitig zugegebenem Phenoxybenzamin; Statistischer Vergleich: (**-***)) Angebotsseite Lumen gegen Blut (o-ooo) Versuche gleicher Angebotsseite mit gegen ohne VK; Kontrolle+VK gegen PBA+VK

Vorinkubation		Kontrolle		Kontrolle + VK		PBA + VK	
Angebotsseite		Lumen	Blut	Lumen	Blut	Lumen	Blut
Gewebsgehalt	(%)	131,5	1011,7***	86,2	768,5***	141,5	1253,7***
	S.E.M.	7,2	90,1	17,8 ^{ns}	46,3 ^o	16,0 ^o	77,2 ^{ooo}
	N	4	4	5	5	5	5
Permeation PABA	(%)	0,252	7,833***	0,086	8,057***	0,497	3,125***
	S.E.M.	0,061	1,051	0,020 ^o	0,555 ^{ns}	0,117 ^o	0,111 ^{ooo}
	N	4	4	5	5	5	5
PEG900	(%)	0,644	0,648 ^{ns}	0,286	0,352 ^{ns}	0,699	0,413 ^{ns}
	S.E.M.	0,247	0,184	0,018 ^{ns}	0,038 ^{ns}	0,129 ^o	0,068 ^{ns}
	N	3	4	5	5	5	4

Die Permeationsraten des Substrates sind durch die zweistündige Vorinkubation der Versuchskammern nicht beeinflusst. Geringe Differenzen, vor allem der Permeationsrate nach lumenseitigem Angebot, erklären sich aus der unterschiedlichen shunt-Permeabilität der Mukosae. Nach einer Vorinkubation ist ein etwas geringerer Anteil an Tracer im Gewebe zu bestimmen. Insgesamt bleibt dieser Effekt jedoch weit hinter der für die Gewebsgehalte von β -NO charakteristischen Asymmetrie in Abhängigkeit von der Angebotsseite zurück; mit oder ohne Vorinkubation läßt sich ein 8-9 mal höherer Gewebespiegel nach blutseitigem Angebot im Vergleich zum lumen-seitigem Angebot bestimmen.

Unter Einfluß von PBA kommt es zu einer deutlichen Inhibition des sekretorischen Flußes; die Permeationsrate nach lumenseitigem Angebot ist dagegen erhöht. Die Hemmung der Netto-Sekretion ist jedoch nicht vollständig; auch unter Einfluß von PBA verbleiben statistisch signifikant unterschiedliche Flußraten in Abhängigkeit von der Angebotsseite. Die Gewebsgehalte verändern sich durch die Gabe von PBA nicht so deutlich wie die Permeationsraten. Insgesamt bewirkte der Inhibitor eine Steigerung der Gewebsgehalte, wobei der erreichte Wert bei lumenseitigem Substratangebot den Vergleichswert der Versuchskammer ohne Vorinkubation nur geringfügig

übersteigt. Die stärkste Veränderung des Gewebsgehaltes ist bei der hochsignifikanten Steigerung nach blutseitigem Substratangebot und Inhibitorgabe zu beobachten. Hier übersteigt der Gewebsgehalt deutlich und statistisch hochsignifikant den ohne Vorinkubation erreichten Wert.

8. Diskussion der Permeationsmechanismen organischer Säuren am Colon

8.1. Passive Parameter und Homogenität der Methode der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Colons

Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der eingesetzten Methode der isolierten Mukosa nach Lauterbach (1971,1977) bietet sich ein Vergleich der passiven Parameter wie Feuchtgewicht, ER und shunt-Permeabilität an. Wenn nicht anders ausgeführt, bezieht sich dieser Vergleich immer auf die mit Krebs-Tris-Glukose-Mannit Puffer, pH 7,00, bei 37°C unter Sauerstoffbegasung inkubierten Versuchskammern. Ein Vergleich mit Angaben anderer Autoren (Petersen, 1984, Giese, 1983, Fries, 1986, Riese, 1987) mit einer vergleichbaren Inkubationsbedingung ergibt, bis auf die an späterer Stelle zu diskutierenden Unterschiede in der shunt-Permeabilität, eine gute Übereinstimmung innerhalb dieser Parameter.

Das Feuchtgewicht der isolierten Mukosa des Colons ist mit 5,5 mg etwa halb so groß wie das des Jejunums. Die absoluten extrazellulären Räume der Lumen- und der Blutseite sind dagegen für beide Darmabschnitte in etwa gleich. Bei einem Vergleich zwischen ein- oder beidseitigem Markerangebot erweist sich der prozentuale Anteil des lumen- und blutseitigen Extrazellulärspaces als voneinander unabhängig, so daß der Gesamt-ER bei einseitigem Angebot durch eine einfache Addition beider Räume mit 55% des Feuchtgewichtes ermittelt werden kann.

Die Größe des lumenseitigen ER war im Vergleich zwischen Präparaten verschiedener Versuchstiere sehr uneinheitlich; eine statistisch signifikante Abweichung von einer Normalverteilung läßt sich jedoch nicht absichern. Ein lumenseitig zum Teil vergrößerter ER könnte in einer gesteigerten Mucus-Sekretion bei einzelnen Versuchstieren begründet sein. Ob dieser Mechanismus dabei ein Artefakt des Versuchsverlaufes -andere Narkosezeiten etc.- darstellt oder funktionell an einzelne Versuchstiere gekoppelt ist, kann hier nicht entschieden werden.

Die shunt-Permeabilitäten des Colons sind, wenn auch nur geringfügig, größer als die des Jejunums. Im Gegensatz zu diesem Darmabschnitt konnte im Mittel aller Versuche auch keine Vorzugsrichtung der Marker-Permeation nachgewiesen werden. Eine bei blutseitigem Angebot höhere PEG- oder Inulin-Permeation konnte dagegen in vergleichbaren Studien von Giese (1983), Petersen (1984) und Riese (1987) belegt werden.

Eine Inkubation bei 7°C bewirkte eine Erhöhung des Feuchtgewichtes, des lumenseitigen ER und eine Verminderung der shunt-Permeabilität. Im Vergleich zum Jejunum fällt die Minderung der parazellulären Permeabilität wesentlich geringer aus und ist mit einem Q_{10} -Wert von 1,14 über den rein physikalischen Einfluß der Temperatur auf den Diffusionskoeffizienten erklärbar. Die Steigerung des lumenseitigen ER und die dadurch bedingte Erhöhung des Feuchtgewichtes steht in guter Übereinstimmung zu Untersuchungen von Giese (1983) und beruht wahrscheinlich auf einer gesteigerten **Sekretion von Mucus**. Die Verminderung der shunt-Permeabilität konnte dagegen von Giese (1983) nicht beobachtet werden. Grundlage dieser Differenz könnte ein unterschiedlich hoher Anteil an, mit einer Marker-Permeation größer 1 % (für PEG900), als "undicht" definierten Mukosa-Präparaten sein. Sind im Versuchsmaterial Mukosae enthalten, die diesem Kriterium mit einer Permeationsrate zwischen 1 und 1,6 % bei 37°C entsprechen, so würde dieses Material dagegen bei 7°C und einem Q_{10} von 1,14 mit einer Permeabilität von jetzt kleiner 1 % als ausreichend dicht angesprochen werden. Ein vergleichsweise größerer Anteil dieser Kammern könnte dann das Mittel der Marker-Permeation erhöhen.

Der Wechsel des Puffermediums zwischen einem tris- und einem bis-tris-gepufferten Medium führt, bei identischen pH-Werten beider Puffer, zu keiner Änderung in den passiven Parametern. Eine Inkubation in einem sauren (pH5,88) oder alkalischen (pH8,00) Puffer ist dagegen von einer Erhöhung des lumenseitigen Extrazellulär-raumes und, damit verbunden, einer Steigerung des Feuchtgewichtes begleitet. Wie bei der Inkubation bei 7°C könnte dies auf eine Steigerung der Mucus-Sekretion zurückzuführen sein. Die bei dem

pH-Wert von 8,00 generell und bei 5,88 nur bei lumenseitigem Angebot zu beobachtende erhöhte shunt-Permeabilität könnte auf eine Schädigung des Gewebes hinweisen. Für diesen Befund spricht auch der mit 24 % (gegenüber sonst weniger als 5 %) vergleichsweise hohe Anteil an "undichten" Versuchskammern mit einer PEG-Permeation größer 2%, die aus eben diesem Grunde allerdings nicht in eine weitere Auswertung übernommen werden konnten.

8.2 Permeationsmechanismus von PABA und H⁺-Sekretion am Colon

Die Permeationsraten von PABA sind am Meerschweinchen-Colon bei einem einseitigen Angebot der Säure in resorptiver Richtung bedeutend höher als in der sekretorischen Richtung. Diese ausgeprägte Netto-Resorption bestätigt sich auch bei einem beidseitigen Angebot; hier kommt es zu einer Anreicherung des Tracers in der blutseitigen Inkubationslösung bis zu einem Verhältnis von 1 : 48. Parallel zur Verteilung des Substrates wird die lumenseitige Inkubationslösung angesäuert und die blutseitige Inkubationslösung alkalisiert. Bei diesem Befund lag nahe, im Mechanismus der lumenseitigen Ansäuerung eine der treibenden Kräfte des Netto-Transportes der Säure zu vermuten. Dies führte zu einer Reihe von Versuchen, in denen einerseits die biochemische Grundlage der Ansäuerung, andererseits der Einfluß dieser Ansäuerung auf die Permeation des PABA untersucht werden sollte.

Eine mit 10 μ M geringe Konzentration von PABA im Inkubationsmedium nimmt selbst keinen Einfluß auf die Ansäuerung des lumenseitigen oder die Alkalisierung des blutseitigen Inkubationspuffers. So konnte in den entsprechenden Experimenten im Regelfall immer im gleichen Versuch der Einfluß der Inkubationsbedingung auf die Ansäuerung/Alkalisierung wie auf die Permeation von PABA untersucht werden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird im nachfolgenden Text die Diskussion des Mechanismus der Änderung der pH- Werte beider Inkubationsmedien der Diskussion der Permeationsmechanismen des PABA vorangestellt.

8.3.1 H⁺-Sekretion des Colons

Eine Ansäuerung des lumenseitigen Inkubationsmediums konnte im Rahmen dieser Studie unter einer Vielzahl von experimentellen Bedingungen belegt werden. In allen Versuchen wurde dabei ein bikarbonat- und kohlendioxidfreier Inkubationspuffer eingesetzt. Die Wahl des Puffermediums -eingesetzt waren Tris, Hepes und Bistris-Puffer- wie auch der Ausgangs-pH der Inkubationslösung hatte dabei prinzipiell keinen Einfluß auf eine lumenseitige Ansäuerung. Die Ansäuerung des lumenseitigen Inkubates ist nicht auf den *in vitro*-Befund beschränkt; auch bei einer *in situ*-Perfusion des Meerschweinchen-Colons läßt sich eine kontinuierliche Ansäuerung des lumenseitigen Perfusates belegen.

Im Gegensatz zur Ansäuerung findet sich eine blutseitige Alkalisierung der Inkubationsmedien nicht bei allen pH-Werten. Eine Alkalisierung tritt nur bei einem pH-Wert der Inkubationslösung kleiner als 7,2 auf. Ist der pH-Wert des Mediums alkalischer als dieser Wert, so kommt es auf der Blutseite wie im lumenseitigen Inkubat zu einer Ansäuerung des Inkubationsmediums. Dieser Befund bestätigt sich auch in den Versuchen mit einem beidseitigen Angebot des PABA. Während sich der pH-Wert des lumenseitigen Inkubates kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum in den sauren Bereich verschiebt, bleibt der blutseitige pH-Wert nach einer leichten Verschiebung in den alkalischen Bereich auf einem Wert von 7,26 in dem Zeitraum nach 45 min Inkubation stabil.

8.3.2 Abhängigkeit vom Metabolismus

Merkmale aktiver Transportmechanismen sind Stoffwechselabhängigkeit und die Fähigkeit des Transportes gegen einen elektrochemischen Gradienten. Bei der anaeroben Inkubation ist die in der Aerobiose zu beobachtende Polarität der Abgabe saurer und basischer Einheiten aufgehoben. Dagegen werden die im anaeroben Stoffwechsel -wie sich aus der Bilanz der insgesamt abgegebenen sauren und basischen Äquivalente ergibt- vermehrt gebildeten sauren Ein-

heiten im gleichen Ausmaß in die lumen- wie in die blutseitige Inkubationslösung abgegeben. Die dabei auftretende Ansäuerung der lumenseitigen Lösung entspricht jedoch nur einem Drittel der in der aeroben Bedingung abgegebenen Wasserstoffionen. Eine in der Inhibition des Stoffwechsels begründete Hemmung der Wasserstoffionensekretion kann auch bei einer blutseitigen Gabe der, als Entkoppler der Atmungskette bekannten, Salicylsäure (Brody, 1956, Bosund, 1957, Thompkins und Leu, 1969, Jörgensen und Mitarbeiter, 1976) beobachtet werden.

Als weiteres Indiz für den aktiven Transport der Protonen kann die Ansäuerung gegen einen Konzentrationsgradienten angeführt werden. Wie an anderer Stelle ausführlicher diskutiert, zeichnen sich biologische Systeme durch eine relative Konstanz des intrazellulären pH-Wertes aus. Eine Ansäuerung des lumenseitigen Mediums konnte dagegen auch im Bereich von sehr sauren pH-Werten in der luminalen Lösung beobachtet werden, die darüberhinaus intrazellulär zu einer schweren Schädigung der Zellen führen sollten. Der in der basolateralen Membran lokalisierte und die blutseitige Alkalisierung vermittelnde Transportmechanismus vermag dagegen basische Äquivalente nicht gegen einen Konzentrationsgradienten abzugeben. Damit entspricht dieses Transportsystem eher den Kriterien einer vermittelten Diffusion, über die kein Transport gegen einen Gradienten möglich ist.

8.3.3 Protonencarrier als molekulare Basis der Ansäuerung

Obwohl gerade im Bereich des Colons eine große Anzahl an Untersuchungen zur Permeation anorganischer Ionen durchgeführt wurden, liegen nur wenige Befunde zur Exkretion saurer oder basischer Einheiten in das Darmlumen vor. Bei einer Inkubation der Mukosae mit Bikarbonat im serosalen, jedoch nicht im mucosalem, Medium konnte eine Alkalisierung des Darmlumens am Kaninchen-Colon von Sullivan und Smith (1986) beobachtet werden. Diese Alkalisierung trat jedoch nicht unter Einfluß beidseitig HCO_3/CO_2 -freier Lösungen oder unter Einfluß von lumenseitig angebotener Glukose (10 mM) auf.

Schanker (1959) konnte bei einer Perfusion des Ratten-Colons keine Ansäuerung der lumenseitigen Perfusionslösung feststellen. Auf der Grundlage dieser zur Ansäuerung am Meerschweinchen-Darm konträren Befunde wurde auch in der vorliegenden Studie ein Versuch der in situ-Perfusion an der Ratte durchgeführt. Im Gegensatz zum Meerschweinchen-Colon findet sich am Ratten-Colon keine Ansäuerung der Perfusionslösung; der pH-Wert des Perfusates stabilisiert sich nach 45 min bei einem Wert von 7,33. Damit scheinen für die Mechanismen einer Ansäuerung des Darmlumens ausgeprägte Spezies-Differenzen zu existieren.

Eine Sekretion von Wasserstoffionen könnte nach dem heutigen Stand des Wissens über die Aktivität einer K^+/H^+ -ATPase wie auch über einen Na^+/H^+ -Carrier oder über beide Systeme gleichzeitig bewirkt werden. Hinweise auf einen Na^+/H^+ -Austausch, bei dem Protonen im Austausch zum Natrium aus dem intrazellulären Raum abgegeben werden, sind in einer Vielzahl von Epithelien aufgefunden worden (Übersicht bei Grinstein und Rothstein, 1986). Von besonderer Bedeutung ist dieser Transportmechanismus bei der lumenseitigen Wasserstoffionen-Sekretion im proximalen Teil des Nephrons (Lang und Mitarbeiter, 1986, Nord und Mitarbeiter, 1985).

Die Existenz eines Na^+/H^+ -Countertransportes konnte auch in der apikalen Membran des Kaninchen-Colons (Ahn und Mitarbeiter, 1985), der apikalen Membran des Ratten-Colons (Sellin und De Soigne, 1984) und an isolierten Bürstensaum-Vesikeln des Ratten-Colons (Foster und Mitarbeiter, 1986) nachgewiesen werden. Binder und Rawlins (1973) fanden in der lumenseitigen Membran des Kaninchen-Colons Hinweise auf eine gekoppelte Aktivität eines Na^+/H^+ - und eines Cl^-/HCO_3^- -Carriers, wobei beide Systeme, ähnlich den am Ileum beschriebenen Mechanismen, eine elektroneutrale Resorption von NaCl ermöglichen sollen.

An isolierten Bürstensaum-Vesikeln des Kaninchen-Colons wurde die Aktivität einer K^+/H^+ -ATPase beschrieben (Gustin und Goodman, 1981, 1982, Kaunitz, 1986). Das Vorhandensein dieser ATPase konnte auch am Colon der Ratte mit monoklonalen Antikörpern der K^+/H^+ -

ATPase der Magenmukosa bestätigt werden (Foster und Mitarbeiter, 1984). Die Fähigkeit dieses Carriers zur Sekretion von Wasserstoffionen wurde von Suzuki (1984) in einer Präparation der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Colons untersucht. In einem Präparat unter voltage-clamp und pH-Stat-Bedingungen konnte dabei eine kaliumabhängige und über Acetazolamid hemmbare Sekretion von H^+ -Ionen in das lumenale Inkubat nachgewiesen werden. Suzuki (1984) diskutiert als Grundlage der Sekretion einen Mechanismus ähnlich dem der Belegzellen der Magen-Mukosa.

Die lumenseitige Ansäuerung des Inkubationsmediums konnte in der vorliegenden Untersuchung in Übereinstimmung mit Suzuki (1984) über eine kaliumfreie Inkubation inhibiert werden. Damit bestätigt dieser Befund die Hypothese eines kaliumabhängigen Carriersystems, das aufgrund des elektrochemischen Gradienten des Kaliums zwischen Medium und intrazellulärem Raum primär energetisiert sein sollte.

8.3.4 Einfluß des Herzglykosides Ouabain auf die Ansäuerung

Eine vollständige Unterdrückung der lumenseitigen Ansäuerung konnte nur mit einer lumenseitigen Gabe von 1 mM Ouabain erzielt werden. Das blutseitig gegebene Herzglykosid war dagegen weniger wirksam. Lumenseitig gegebenes Ouabain wirkt darüberhinaus stärker auf den Mechanismus der blutseitigen Alkalisierung als der blutseitig gegebene Inhibitor. Die Hemmwirkung des Ouabains sollte damit in der direkten Inhibition der K^+/H^+ -ATPase in der lumenseitigen Membran begründet sein.

Über den Einfluß von Ouabain auf die Aktivität einer K^+/H^+ -ATPase im Colon liegen in der Literatur widersprüchliche Angaben vor. Eine Übersicht zu der für die Diskussion einer kaliumabhängigen ATPase wichtigen transzellulären Permeation des Kaliums findet sich bei Smith und McCabe (1984). Eine spezifische Hemmung der Kalium-Sekretion über die Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase in der basolateralen Membran wird dabei von McCabe und Mitarbeitern

(1982, 1984) am Kaninchen-Colon beschrieben. Der resorptive Fluß dieses Ions konnte dagegen in der gleichen Untersuchung nicht durch Ouabain, jedoch durch den metabolischen Inhibitor 2,4-Dinitrophenol gehemmt werden. Die von Gustin und Goodman (1982) beschriebene K^+/H^+ -ATPase der lumenseitigen Membran des Kaninchen-Colons ist, wie die Resorption des Kaliums, nicht durch Ouabain hemmbar. Im Gegensatz hierzu kann die Resorption von Kalium im Schildkröten-Colon über mucosal gegebenes Ouabain inhibiert werden (Halm und Dawson, 1984). Die Autoren diskutieren dabei allerdings einen lumenseitigen Aufnahmemechanismus des Kaliums ähnlich dem der Na^+/K^+ -ATPase in der basolateralen Membran. Nach Kaunitz (1986) kann die von ihm am Kaninchen-Colon isolierte K^+/H^+ -ATPase, im Gegensatz zu Gustin und Goodman, durch das Herzglycosid vollständig gehemmt werden. Die von Suzuki (1984) beschriebene K^+/H^+ -ATPase der apikalen Membran des Meerschweinchen-Colons konnte mit Ouabain inhibiert werden. Lumenseitig gegebenes Ouabain war dabei wirksamer als blutseitig gegebenes; $10^{-4}M$ blutseitig zugegebenes Ouabain verminderte in dieser Studie die H^+ -Sekretion um 40 %, während eine halbmaximale Inhibition der lumenseitigen H^+ -Sekretion schon bei einer Konzentration von $4 \cdot 10^{-6}M$ lumenseitig zugegebenem Ouabain erreicht werden konnte.

8.3.5 Hemmung des H^+ -Carriers durch Amilorid und Omeprazol

Die Hemmung eines Na^+/H^+ -Carriermechanismus kann prinzipiell über zwei Maßnahmen bewirkt werden: (1) durch Hemmung des Ansäuerungsmechanismus über eine Inkubation in einem an Natriumionen armen Medium oder (2) über spezifische Hemmstoffe des Carriers. In Anbetracht der vielfältigen Möglichkeiten der Einflußnahme einer Na^+ -freien Inkubation, z.B. auch auf den intrazellulären pH-Wert oder das Potential der Enterocyten, erschien eine direkte spezifische Hemmung des Na^+/H^+ -Carriers als günstiger. Mit dem Diuretikum Amilorid steht dabei eine Verbindung zur Verfügung, welche hochspezifisch verschiedene Transportmechanismen von Natriumionen und speziell auch den Na^+/H^+ -Carrier zu hemmen vermag (Übersicht bei Benos, 1982).

Das, im Versuch in beiden Inkubationsmedien, eingesetzte Amilorid zeigte keine Wirkung auf den Mechanismus der Ansäuerung/Alkalisierung. Die dabei gewählte Konzentration von 2 mM sollte, bei einer Inhibitionskonstante von $7,6 \mu\text{M}$ am Colon der Ratte und $0,01 \mu\text{M}$ am Colon des Schweines (Benos, 1982), für eine Hemmung der Abgabe saurer Äquivalente ausreichen. Eine über einen lumenseitigen Na^+/H^+ -Carrier bewirkte Ansäuerung des Darmlumens erscheint damit am Präparat des isolierten Meerschweinchen-Colons als unwahrscheinlich. In der Versuchsbedingung der Stimulation der H^+ -Sekretion durch eine lumenseitig chloridfreie Inkubation kommt es zu einer geringfügigen Inhibition der Ansäuerung, wobei jedoch nicht der gesamte stimulierende Effekt aufgehoben wird.

Konnte der Mechanismus der Ansäuerung nicht über Amilorid gehemmt werden, so sollte ein spezifischer Hemmstoff der K^+/H^+ -ATPase die H^+ -Sekretion inhibitorisch beeinflussen. Ein solcher Hemmstoff steht in neuerer Zeit mit dem substituierten Benzimidazol Omeprazol zur Verfügung. Omeprazol wurde zur Hemmung der K^+/H^+ -ATPase der Magen-Mukosa entwickelt (Fellenius und Mitarbeiter, 1981, Elander und Mitarbeiter, 1986), vermag jedoch auch die H^+ -Sekretion am Jejunum des amerikanischen Aalmolches zu hemmen (White, 1985).

Im Gegensatz zu diesem Befund zeigt Omeprazol in unserem Präparat bei einer Konzentration von bis zu $250 \mu\text{M}$ keinerlei Wirkung auf die lumenseitige Ansäuerung des Inkubationsmediums. Damit ist dieser Befund einer Studie von Grinpukel und Mitarbeitern (1986) vergleichbar, die ebenfalls keinen Effekt von Omeprazol auf die Aktivität einer K^+/H^+ -ATPase hepatischer Lysosomen feststellen konnten. Die Ursache der fehlenden inhibitorischen Wirkung könnte in dem, für das durch Säure aktivierbare Omeprazol, zu alkalischen pH-Wert am Wirkort begründet sein.

8.3.6 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Carrier und Alkalisierung

In den Beleg-Zellen der Magen-Mukosa (Rehm und Sanders, 1975) oder im Epithel des proximalen Tubulus der Niere (Brisolla-Diuana und Mitarbeiter, 1985, Sasaki und Mitarbeiter, 1985) werden die bei der Ansäuerung der Lumenseite anfallenden basischen Äquivalente über einen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Carrier in der contraluminalen Membran abgegeben. Ein vergleichbarer Transportmechanismus könnte auch die in unserer Präparation beobachtete Alkalisierung der blutseitigen Inkubationslösung bewirken. Ausgehend von dieser Modellvorstellung sollte eine Inkubation mit einem blutseitig chloridfreien Inkubationsmedium den Mechanismus der Abgabe von Bikarbonat an der basolateralen Membran hemmen.

Tatsächlich führte eine chloridfreie Inkubation zu einer Inhibition der Abgabe basischer Äquivalente. Diese inhibitorische Wirkung konnte nur über eine blutseitige oder beidseitig chloridfreie Inkubation erzielt werden, wobei das für Chlorid eingesetzte Ersatz-Anion -Gluconat oder Sulfat- keinen Einfluß auf die Inhibition der Abgabe basischer Äquivalente hatte. Von Ullrich und Mitarbeitern (1980) wird für die basolaterale Membran des proximalen Tubulus der Ratten-Niere ein Transportmechanismus, über den Bikarbonat im Austausch gegen Sulfat transportiert werden kann, diskutiert. Da Sulfat im Inkubationsmedium jedoch am Meerschweinchen-Colon Chlorid nicht zu ersetzen vermag, erscheint an diesem Organ die Existenz eines solchen Carriers unwahrscheinlich.

Bei einer lumenseitig chloridfreien Inkubation kommt es zu einer Stimulation der lumenseitigen Ansäuerung. Dieser Überraschende Befund könnte in einem von Chlorid abhängigen Abgabemechanismus für Bikarbonat in der lumenseitigen Membran eine Erklärung finden. Eine Unterdrückung dieser Abgabe durch eine Depletion des Gegenions könnte nun den zu der Ansäuerung des Darmlumens antagonistischen Mechanismus der Bikarbonat-Sekretion hemmen und damit die tatsächliche Leistung der H^+ -sezernierenden Systeme offenlegen.

Eine Sekretion von Bikarbonat in das Darm-Lumen wurde bisher für verschiedene Spezies am Colon beschrieben (Parsons, 1956, Phillips und Schmalz, 1970, Garcia und Mitarbeiter, 1984, Übersicht bei Schultz, 1981). Im Gegensatz zu diesem Befund konnten Vogel und Mitarbeiter (1970) bei der Instillation von jejunalem Enterosorbit mit einem hohen Anteil an Bikarbonat eine Verminderung der Konzentration dieses Anions von 87 auf 53 meq/l feststellen. Die Permeabilität des Bikarbonates wird nach Phillips und Schmalz (1970) über einen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Carrier in der apikalen Membran in einem nicht energetisierten Mechanismus vermittelt. Die Existenz eines solchen Carriersystems könnte auch die widersprüchlichen Angaben zur Resorption/Sekretion des Bikarbonates erklären: je nach Konzentration des Chlorides oder des Bikarbonates im Medium und in der Zelle wird das Bikarbonat über das Epithel netto-resorbiert oder netto-sezerniert.

8.3.7 Inhibition des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Carriers durch SITS und PBA

Eine blutseitige Alkalisierung des Inkubationsmediums wird durch blutseitig gegebenes SITS inhibitorisch beeinflusst. Das Stilbenderivat SITS ist ein bekannter Hemmstoff des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers in roten Blutkörperchen (Cabantchik und Rothstein, 1972). Die in unseren Versuchen vergleichsweise nur geringe Hemmwirkung des SITS korrespondiert zu einem Befund von Grinstein und Mitarbeitern (1980), die eine nur geringe Einflußnahme des Stilbens DIDS auf den Efflux von Chlorid aus basolateralen Vesikeln des Nieren- und Dünndarmepithels feststellen konnten. Langridge-Smith und Field (1981) berichten in Übereinstimmung mit diesem Befund, daß blutseitig gegebenes SITS keinen Einfluß auf einen serosalen Transport von Chlorid am Kaninchen-Ileum hat. Neuere Untersuchungen am isolierten Kaninchen-Colon deuten auf einen weiteren, von der Wirkung auf den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Carrier unabhängigen, Mechanismus der Inhibition des Transportes von Chlorid hin (Smith und Mitarbeiter, 1986).

Das β -Haloalkylamin PBA ist als alkylierendes Agens ein relativ unspezifischer Inhibitor, der neben einer Reihe von anderen Transportprozessen in der vorliegenden Untersuchung auch den Transport von β -Naphtholorange am Jejunum und Colon zu hemmen vermag. Mit blutseitig gegebenem Phenoxybenzamin kann eine Alkalisierung des blutseitigen Inkubationsmediums und damit wahrscheinlich der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher der basolateralen Membran ebenfalls gehemmt werden.

Lumenseitig gegebenes SITS und PBA haben, im Gegensatz zu den Versuchen mit blutseitigem Angebot, keinen Einfluß auf den Mechanismus der Ansäuerung / Alkalisierung an der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Colons. Obwohl in Versuchen mit einer lumenseitigen Gabe des PBA keine Untersuchungen zum pH-Wert der Inkubationsmedien am Versuchsende durchgeführt werden konnten, weist die in diesen Versuchen erhalten gebliebene Resorptionsquote des PABA auf einen fehlenden Einfluß des lumenseitig gegebenen PBA auf den Mechanismus der Ansäuerung hin.

8.3.8 Inhibition der Carboanhydrase mit Acetazolamid

Das Colon des Meerschweinchen weist im Vergleich zu anderen Abschnitten des gastrointestinalen Traktes sehr hohe Aktivitäten an Carboanhydrase (CA) auf. Die Aktivität dieser Enzyme ist dabei der Aktivität in der Magen-Mukosa vergleichbar (Carter und Parsons, 1970, 1973, Lönnerholm, 1977). Der am Meerschweinchen-Colon in dieser Untersuchung nachgewiesene Mechanismus der lumenseitigen Ansäuerung könnte nun eine Antwort auf die bisher offene Fragestellung nach der Aufgabe dieser Enzymaktivität bieten. In der aeroben Glykolyse des Stoffwechsels entsteht als Endprodukt der Verbrennung von Glukose Kohlendioxid. Carboanhydrase katalysiert nun die Umwandlung dieses Kohlendioxids zu Kohlensäure, welche bei physiologischen pH-Werten wiederum in Protonen und Bikarbonationen dissoziiert. Damit könnte zumindest ein Teil der zur Lumenseite abgegebenen Wasserstoffionen wie auch die gesamten Bikarbonationen über den aeroben Zellstoffwechsel bereitgestellt werden. Eine in-

hibitorische Beeinflussung der Carboanhydraseaktivität über einen Hemmstoff wie Acetazolamid sollte nach diesem Modell sowohl die Ansäuerung wie die Alkalisierung hemmen.

Eine Inkubation des Gewebes mit 0,1 mM Acetazolamid führte im Experiment auch zu der vorhergesagten Einschränkung beider Mechanismen. Dieser Effekt konnte über eine Vorinkubation des Gewebes mit dem CA-Blocker noch weiter gesteigert werden, da unter dieser Bedingung schon am Inkubationsbeginn ein ausreichender Gewebespiegel gewährleistet war. Die dabei aufgetretene vollständige Unterdrückung einer blutseitigen Alkalisierung des Inkubationsmediums könnte zum Teil auch in einer direkten inhibitorischen Wirkung des Acetazolamids auf den Bikarbonat-Carrier, wie sie von Burckhardt und Frömter (1980) für die basolaterale Membran des proximalen Tubulus der Ratten-Niere diskutiert wurde, begründet sein.

8.3.9 Puffer-Effekt hoher Konzentrationen der Substrate

Eine lumenseitige Ansäuerung des Inkubationsmediums führt bei einem lumenseitigen Angebot von PABA oder Salicylat zu einer Steigerung des Anteils der freien Säure und, damit verbunden, zu einer vergleichsweise hohen Resorptionsquote. Wenn nun die beiden Substrate dabei in der protonierten Form die apikale Membran permeieren, werden gleichzeitig Protonen der lumenseitigen Lösung entzogen und damit die Ansäuerung des Inkubationsmediums vermindert.

Dieser Mechanismus läßt sich bei einem Angebot von 50 mM PABA quantitativ abschätzen. Nach lumenseitigem Angebot finden sich dabei 6,16 % der eingesetzten Menge oder 616 nmol Substanz im blutseitigen Inkubat. Unter der vereinfachten Annahme der vollständigen Permeation des monovalenten PABA in Form seiner freien Säure entspricht dies 616 nmol transferierten Protonen. Nach Addition dieses Wertes zu den Wasserstoffäquivalenten der Lumenseite und Subtraktion von denen der Blutseite ergibt sich eine Ansäuerung von +646,7 nmol im lumenseitigen und -428,0 nmol im blut-

seitigen Inkubat. Damit überschreitet dieser Wert die sonst mit 492,9 nmol auf der Lumen- und -222,8 nmol auf der Blutseite zu beobachtende Ansäuerung bei 0,01 mM Substratangebot. Die Minderung der Ansäuerung bei 50 mM lumenseitig gegebenem PABA läßt sich damit vollständig aus der Substratbewegung erklären; die Differenz zwischen dem errechneten und dem experimentellen Wert ergibt sich aus dem parazellulären Anteil der Permeation und einer möglicherweise verstärkt einsetzenden Rücksekretion der Protonen aus dem intrazellulären Raum der Enterocyten.

Nicht über diese Modellvorstellung erklärbar bleibt jedoch die Einschränkung der Ansäuerung bei einem blutseitigen Angebot von 50 mM PABA. Wie sich dabei allerdings aus der Regressionsanalyse der Marker- und Substratpermeation ergibt, könnte ein großer Anteil des von der Blut- zur Lumenseite überwiegend parazellulär Übergetretenen PABA aus der lumenseitigen Inkubationslösung wieder rückresorbiert werden. Grundlage dieser resorptiven Komponente der Flußrate sollte dabei der höhere Anteil an freier Säure im lumenseitigen Inkubat sein, so daß es auch hier zu einem Puffereffekt hoher Dosen von PABA kommen kann. Die dabei gegenüber dem lumenseitigen Angebot wesentlich geringeren Quantitäten an resorbiertem PABA stimmen dabei sehr gut mit der ebenfalls geringeren Minderung der Ansäuerung überein.

Der beschriebene Puffereffekt könnte auch zum Teil für die Einschränkung der Ansäuerung bei der Gabe von 10 mM Salicylat verantwortlich sein. Salicylsäure wird, wie an anderer Stelle ausführlicher diskutiert, über den gleichen Mechanismus wie PABA resorbiert. Im Gegensatz zu diesem Substrat läßt sich hier jedoch die bei blutseitiger Gabe wesentlich stärkere Einschränkung der Ansäuerung bei der gleichzeitig geringeren Angebotskonzentration nicht allein über den rückresorbierten Anteil erklären. Der mögliche Einfluß des Salicylates auf den Stoffwechsel ist an anderer Stelle diskutiert.

Ein weiterer Aspekt der Resorption von PABA und Salicylsäure in Form ihrer freien Säuren ergibt sich aus den erheblichen Quanti-

täten an Protonen, die auf diese Weise bei der Gabe hoher Dosen in den Enterocyten verbraucht werden. Ein vergleichbarer Mechanismus wird an der Magen-Mukosa für einen Teil der unter Salicylsäure auftretenden Gewebeschäden verantwortlich gemacht (Davenport, 1965a, 1965b, 1966, 1969). Eine Parallele dieser Schädigung könnte sich in der unter Einfluß von 50 mM PABA aufgetretenen erhöhten shunt-Permeabilität finden.

8.3.10 Koppelung von Ansäuerung und Alkalisierung

Wenn in den Versuchsansätzen gezielt nur eines der beiden Transportsysteme der Ansäuerung oder Alkalisierung beeinflußt werden sollte, so war in allen Fällen auch eine Inhibition des anderen Ionencarriers zu beobachten. Dieser Befund weist auf eine Koppelung beider ionensezernierender Mechanismen hin und deutet zugleich auf Systeme, über die der intrazelluläre pH-Wert der Zellen stabilisiert wird. Die Koppelung beider Transportmechanismen könnte im einfachsten Falle über eine Steigerung der passiven Permeation nach Erhöhung der intrazellulären H^+ - oder HCO_3^- -Konzentrationen bewirkt werden.

Ein Beispiel für die Beziehung zwischen dem intrazellulären pH-Wert und einem Anionenaustauscher der basolateralen Membran wird in einer Studie von Johanson und Mitarbeitern (1985) für die Zellen des Plexus choroidaeus der Ratte diskutiert. Die Veränderung der extrazellulären Bikarbonat-Konzentration führte dabei zu einer proportionalen Änderung des intrazellulären pH-Wertes. Eine Inhibition des Cl^-/HCO_3^- -Antiportes über eine serosale Substitution des Chloridgehalts durch Glukonsäure führte bei Duffey und Mitarbeitern (1986) zu einer Steigerung des intrazellulären pH-Wertes der Frosch-Haut von 7,24 auf den pH-Wert des Inkubationsmediums von 7,60. Agarwal und Mitarbeiter (1987) konnten eine Deletionsmutante der Zelllinie LLC-PK₁ des Nierenepithels ohne Na^+-H^+ -Antiport erzeugen. Diese Mutante war im Gegensatz zur Wildform in einem bikarbonatfreien Medium mit einem pH-Wert kleiner 6,5 nicht lebensfähig. Die Bedeutung des Chlorid/Bikarbonat Anti-

portes wie der H^+ -Permeasen in der Regulation des intrazellulären pH-Wertes wird in einem Übersichtsartikel von Roos und Boron (1981) ausführlich diskutiert.

8.3.11 Bilanz der Protonen- und Bikarbonatabgabe

In der Bilanz der von der Mukosa abgegebenen sauren und basischen Äquivalente ergibt sich immer eine Netto-Abgabe von sauren Einheiten. Legt man einen konstanten pH-Wert in der Zelle zugrunde, so können damit die aeroben Stoffwechselwege nicht die alleinige Quelle der abgegebenen Wasserstoffionen sein. Als weitere Quelle von Wasserstoffionen bietet sich dagegen der anaerobe Stoffwechselweg an, über den die Zelle Glukose zu Milchsäure umsetzt. Endogen in der Mukosa gebildete Milchsäure wird am isolierten Meerschweinchen-Colon annähernd vollständig zur Blutseite abgegeben (Petersen, 1984). Als Mechanismus der Abgabe wird ein Carrier-mechanismus ähnlich dem von Storelli und Mitarbeitern (1980) beschriebenen Lactat-Transport in der contraluminalen Membran des Ratten-Jejunums diskutiert. Der hohe Grad der Dissoziation der Milchsäure legt nun einen Transport in Form des Anions nahe, womit das Proton dem lumenseitigen Ansäuerungsmechanismus zur Verfügung stehen könnte.

In guter Übereinstimmung mit diesem Modellbild sind nun die anaeroben Versuche. Die unter dieser Versuchsbedingung vermehrt gebildete Milchsäure (Petersen, 1984) könnte hier die, sowohl zur Lumen- wie zur Blutseite, abgegebenen sauren Einheiten bereitstellen.

8.3.12 Modellbildung zum Mechanismus der Ansäuerung/Alkalisierung

Aus allen Versuchen zum Mechanismus der lumenseitigen Ansäuerung am Meerschweinchen-Colon kann ein Modell der an der lumenseitigen Ansäuerung und der blutseitigen Alkalisierung beteiligten Mecha-

8.4 Permeation schwacher Säuren am Meerschweinchen-Colon

8.4.1 Die Permeation von PABA am Colon: intra- und parazelluläre Anteile

Die Permeation einer Substanz kann in der Mukosa prinzipiell über zwei Wege erfolgen: zum einen über den transzellulären Weg des Enterocyten, der eine Passage der lumenseitigen und der blutseitigen Membran einschließt und zum anderen über den parazellulären Weg der tight-junction Struktur zwischen den Zellen, bei dem kein Membransystem überwunden werden muß. Um nun den Einfluß verschiedener Transport- und Diffusionsvorgänge auf die Permeation abschätzen zu können, wird eine Diskrimination zwischen beiden Flüssen notwendig.

Eine Unterscheidung zwischen intra- und parazellulärem Anteil der Permeation ist prinzipiell bei einem gleichzeitigen Angebot eines für Membransysteme impermeablen Markers möglich. Die Marker-Permeation liefert dabei ein Maß für die parazelluläre Permeation. Die para- und intrazelluläre Substratpermeation ergibt sich aus einer Korrelationsanalyse zwischen Substrat- und Markerflüssen: der Anteil, der sich entsprechend zu der Markerflußrate symmetrisch verändert, sollte dabei parazellulär, der bei einer Markerpermeation von Null verbleibende Anteil intrazellulär vermittelt sein. Dieses Modell ist jedoch nicht anwendbar, wenn der intrazelluläre Anteil der Flußraten gegenüber dem parazellulären Anteil sehr groß wird, da dann die Schwankungen in der intrazellulären Komponente jegliche Korrelation mit den Markerflüssen überdecken.

So läßt sich für die Permeation von PABA bei lumenseitigem Angebot keine Korrelation zur Marker-Permeation errechnen. Weist diese fehlende Korrelation schon auf eine überwiegend intrazelluläre Permeation hin, so kann der parazelluläre Anteil mit dem bei dem blutseitigen Angebot ermittelten Proportionalitätsfaktor zwischen der Marker- und der Substratpermeation zumindest abgeschätzt werden. Bei einer Angebotskonzentration von 10 μM beträgt dabei der

relative Anteil der intrazellulären Permeation 94,7 %, bei 100 μM 96,3 %, bei 2 mM 90,6 %, bei 20 mM 82,4 % und bei 50 mM 38,6 %. Der bei steigender Konzentration drastisch ansteigende Anteil der parazellulären Permeation ergibt sich aus einer sättigungsfähigen transzellulären Permeabilität bei einer gleichzeitig annähernd konstanten Permeation durch die Shunts.

Bei einem blutseitigen Angebot des Substrates läßt sich in der Korrelationsanalyse eine überwiegend parazelluläre Substratpermeation belegen (Tab.23). Bei einer Angebotskonzentration von 0,01 mM permeiert dabei im Tris-Medium 70 % des Substrates auf dem parazellulären Weg und nur 30 % durch die Enterocyten. Bei einer Steigerung der Angebotskonzentration kommt es, bei einer Marker-Permeation von Null, zu einer scheinbar negativen intrazellulären Permeationsrate. Eine solche negative Flußrate ist jedoch bei einer Substratpermeation, die ausschließlich von der Blut- zur Lumenseite erfolgt, nicht möglich. Die Permeation einer Verbindung verläuft jedoch in keinem Fall immer nur in einer Richtung, sondern auch aus dem Raum der Gegenseite zurück in das Angebotsmedium. Aus diesem Grunde stellt auch bei einseitigem Angebot eine Permeationsrate immer die Summe beider Abläufe dar. Wenn nun der Anteil der transzellulären Permeation zurück in das Angebotsmedium größer als der transzelluläre Anteil der Substratbewegung aus dem Angebotsmedium zur Gegenlösung ist, ergibt sich damit eine negative Bilanz beider Flußraten und eine negative intrazelluläre Permeationsrate.

Wie sich aus diesem Modell zwanglos ergibt, muß der diskutierte Effekt immer mit einem ausgeprägten Netto-Transport gekoppelt sein. Tatsächlich konnten Lauterbach und Fischer (1984) eine ähnliche negative intrazelluläre Permeationsrate am Meerschweinchen-Jejunum bei blutseitigem Angebot von D-Glukose oder β -Methyl-D-glykosid beobachten. Die bei blutseitiger Gabe fast ausschließlich parazellulär die Lumenseite erreichenden Zucker wurden hier über den Mechanismus des natriumgekoppelten Transportsystems rückresorbiert, so daß sich ebenfalls ein höherer Anteil der transzellulären Permeation in der resorptiven Richtung ergab. Eine Inhibi-

tion dieses apikalen Transportsystems mit lumenseitig gegebenem Phlorrhizin führte dagegen bei dem blutseitigen Angebot der Zucker zu einer positiven intrazellulären Permeationsrate.

Die aus den Korrelationen zu erschießende Rückresorption von PABA wird erst im Bereich einer höheren Substratkonzentration sichtbar. Eine Sättigung der resorptiven Komponente ist dabei jedoch nicht im Bereich geringer, sondern nur im Bereich hoher Substratkonzentrationen zu erwarten. Dagegen scheint eine Sättigung des intrazellulären Anteils der Permeation in sekretorischer Richtung selbst möglich. Damit weist diese Korrelationrechnung auf eine intrazelluläre Permeation in der sekretorischen Richtung, die einerseits sättigungsfähig und damit potentiell vermittelt, jedoch andererseits aufgrund ihres nur geringen Anteils für die Gesamtpermeationsrate von nur untergeordneter Bedeutung ist.

Der Permeation nach blutseitigem Angebot vergleichbar (wenn auch ohne negative intrazelluläre Durchtrittsrate) sind die Permeationsraten des PABA bei einer Inkubationstemperatur von 7°C. Alle Permeationsraten liegen dabei, unabhängig von der Angebotsseite, auf einer identischen Regressionsgeraden, so daß keine Vorzugsrichtung der Permeation erkennbar ist. Die noch verbleibende Substratpermeation erfolgt überwiegend parazellulär über den PEG-Weg.

8.4.2 Transportmechanismen organischer Säuren am Colon

Permeationsmechanismen organischer Säuren am Colon sind in der Vergangenheit nur spärlich untersucht worden. Schanker (1959) konnte bei Studien zur Resorption organischer Säuren und Basen wie der Nitrobenzoesäure, Salicylsäure, Benzoesäure, Nitrophenol, verschiedenen Barbituraten, Anilin und Chinin am Ratten-Colon keinen Hinweis auf einen vermittelten Transport finden.

Intensiver untersucht worden ist die Resorption kurzkettiger Fettsäuren (Short Chain Fatty Acids, SCFA) im Colon. Die Fettsäuren, die vor allem im distalen Bereich des Darmtraktes über einen bak-

teriellen Aufschluß sonst unverdaulicher Polysaccharide (Hoverstad und Mitarbeiter, 1985) gebildet werden, sind bei vielen Tierarten ein für die Gesamtenergiebilanz wichtiger Nahrungsbestandteil. Ca. 7 % der Gesamtenergie werden beim Hund wie beim Menschen über die Produktion von SCFA im Dickdarm sichergestellt (Cummings, 1981). Bei Tierarten mit rein pflanzlicher Ernährung dominieren die SCFA mit einem Anteil von bis zu 80 % in der Energiebilanz (Stevens und Mitarbeiter, 1980). Herbivore Arten haben dabei zwei Mechanismen zur Aufnahme der SCFA entwickelt: Bei den Wiederkäuern wird SCFA vor allem im Pansen gebildet und dort resorbiert; bei den Nicht-Wiederkäuern ist die Bildung und Aufnahme auf den Bereich des Caecums und des Colons beschränkt. Entsprechend hoch sind die Konzentrationen der SCFA im Bereich des Dickdarmes mit 112 mM im Colon der Ratte (Remesy und Mitarbeiter, 1976), 250 mM im Dickdarm des Schweines (Argenzio und Southworth, 1974), 125 mM im Caecum der weißen Maus (Hoverstad und Mitarbeiter, 1985), 50-60 mM im Caecum des Meerschweinchens (Hagen und Robinson, 1953) und bis zu 190 mM in den Faeces des Menschen (Rubinstein und Mitarbeiter, 1969). Damit stellen die SCFA im Colon das wichtigste Anion dar. Innerhalb dieser Gruppe ist wiederum Acetat das Hauptanion.

Obwohl die SCFA im Dickdarm aller untersuchten Spezies (Übersicht bei Engelhardt und Rechkemmer, 1983, Rechkemmer, 1981) wie beim Menschen (Hoverstad, 1986) gut resorbiert werden können, ist der biochemische Mechanismus der Resorption noch nicht vollständig geklärt. Diskutiert wird die Aufnahme über die lumenseitige Membran in Form der freien Säure über einen Mechanismus der non-ionic diffusion. Aus der Korrelation der Aufnahme von Natrium-Ionen und SCFA wurde geschlossen, daß die benötigten H^+ -Ionen über den Mechanismus eines Na^+/H^+ -Carriers dem Permeationsprozeß zugänglich gemacht werden (Rübsamen und Engelhardt, 1981). Die von Rechkemmer (1981) zur Resorption von Acetat durchgeführten Regressionsanalysen der Natrium-, Wasser- und Acetatflüsse machen jedoch deutlich, daß der überwiegende Anteil des Acetatflusses auch direkt proportional zur Wasserresorption ist und die SCFA auch zusammen mit der Flüssigkeit aufgenommen werden könnten. Die

Korrelation zwischen Natrium- und Acetatfluß könnte sich dabei aus der Rolle des Natriums als Leiton der Wasserresorption ergeben.

Zusätzlich zu diesen, vom Standpunkt der SCFA eher passiven, Resorptionsmechanismen wird im Bereich des proximalen Colons ein Transport der SCFA als Anion über einen in der apikalen Membran lokalisierten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Carrier diskutiert (Argenzio und Mitarbeiter, 1977, Ruppin und Mitarbeiter, 1980, Engelhardt und Reckemmer, 1983). Oxalat soll nach Hatch und Mitarbeitern (1984) ebenfalls über diesen Austauscher an Stelle des Chlorides gegen Bikarbonat in die Zellen aufgenommen werden.

8.4.3 Abhängigkeit der Permeation und Verteilung des PABA vom pH-Wert

Die theoretische Verteilung einer Säure zwischen zwei Räumen mit einem unterschiedlichen pH-Wert läßt sich nach der pH-Verteilungstheorie (Shore und Mitarbeitern, 1957), die sich aus der Henderson-Hasselbalch Gleichung ableitet, berechnen. Aus den pH-Werten der Inkubationslösungen kann so für die Versuche mit einem beidseitigem Angebot von 2 mM PABA, bei einer Inkubationsdauer von 180 min, eine Verteilung mit 99,45 % auf der Blut- und 0,55 % auf der Lumenseite errechnet werden. Die tatsächlich beobachtete Verteilung von PABA mit 97,95 % im blut- und 2,05 % im lumenseitigen Raum zeigt, daß die Gleichgewichtsverteilung tatsächlich erreicht wird.

Die Bedeutung der lumenseitigen Ansäuerung im Permeationsgeschehen wird auch bei einem Vergleich der in situ-Experimente zwischen Meerschweinchen und Ratten-Colon deutlich. Wie bereits an anderer Stelle diskutiert, säuert das Meerschweinchen die lumenale Perfusionslösung an und es kommt zu einer deutlichen Minderung der intraluminalen PABA-Konzentration. Bei der Ratte, der dieser Ansäuerungsmechanismus fehlt, bleibt die Konzentration dagegen gleich. Die in situ-Versuchsergebnisse am Ratten-Colon stehen damit in guter Übereinstimmung zu Untersuchungen von Yasuhara und

Mitarbeitern (1979a), die am everted und uneverted sac des Ratten-Colons gleiche Permeationsraten von PABA in beiden Richtungen feststellen konnten.

Versuche mit unterschiedlichen pH-Werten der Inkubationslösungen sprechen ebenfalls für eine apikale Aufnahme von PABA über Mechanismen der non-ionic diffusion. Dabei ist die Permeation der Säure in der resorptiven Richtung im hohen Maße vom Grade der Ionisation abhängig, wohingegen die Permeation in der sekretorischen Richtung unabhängig vom Grade der Ionisation ist. Im deutlichen Gegensatz zur Permeation ist der Gewebsgehalt auch bei blutseitigem Angebot abhängig vom pH-Wert der Inkubationslösung; zwischen den pH-Werten von 5,88 und 8,00 des Krebs-Bistris Puffers ergibt sich ein Verhältnis der intrazellulären Konzentrationen des Tracers mit dem Faktor 4,6. Damit spricht dieses Resultat für eine äußerst geringe Permeabilität der apikalen Membran für unser Substrat in seiner ionisierten Form. Ein stabiler intrazellulärer pH-Wert (pH_i), unabhängig vom pH-Wert der Inkubationslösung, könnte diesen Mechanismus unterstützen. Die nicht sichtbare Abhängigkeit der sekretorischen Transportrate vom Gewebsgehalt bestätigt darüberhinaus den großen Anteil der parazellulären Permeation.

Das Modell eines stabilen intrazellulären pH-Wertes ist bei einer großen Anzahl von Zellsystemen experimentell bestätigt worden (Übersicht bei Roos und Boron, 1981). Wagner und Mitarbeiter (1985) konnten am Ratten-Colon über die Verteilung von 5,5-Dimethyloxazolidin-2,4-dion (DMO) einen intrazellulären pH-Wert von 6,85 ermitteln. Ein mehr alkalischer pH-Wert konnte über Mikroelektroden in Epithelzellen der Ratten-Niere mit 7,10 (Henderson und Mitarbeitern, 1986) und von Zellen des proximalen Tubulus der Kaninchen-Niere mit 7,22 (Sasaki und Mitarbeiter, 1985) bestimmt werden. Grundlage der Differenz könnte der jeweilige methodische Ansatz sein, in dem mit DMO der mittlere pH-Wert des gesamten intrazellulären Systems der Zelle, mit Mikroelektroden jedoch der cytosolische pH-Wert bestimmt wird.

8.4.4 Ansäuerungsmechanismus und Permeation von PABA

Ein weiteres Argument zur Rolle der lumenseitigen Ansäuerung bei der Permeation ergibt sich aus den Versuchen, in denen die Ansäuerung über Änderungen der ionalen Zusammensetzung der Inkubationsmedien oder verschiedene Inhibitoren gehemmt oder stimuliert wurde. Die Permeationsrate in resorptiver Richtung ist auch in diesem Fall abhängig vom Ausmaß der Ansäuerung; eine Einschränkung der H^+ -Sekretion bewirkt immer eine gleichzeitige Inhibition der Resorptionsrate. Die relative Permeation, in Prozent des Kontrollwertes, ist direkt proportional zu dem Anteil der freien Säure am Versuchsende in der lumenseitigen Inkubationslösung (Abb.48); eine Permeation der ionisierten Form läßt sich in der Regressionsana-

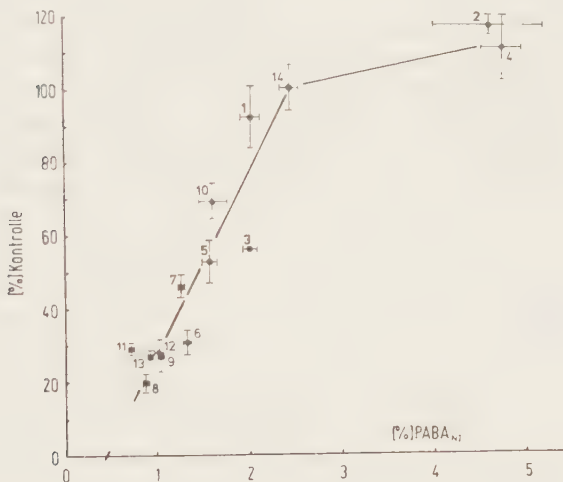


Abb.48: Relative Resorption von 10 μ M PABA in Prozent der mitgeführten Kontrollen gegen Prozent freier Säure im lumenseitigen Inkubat am Versuchsende; Angaben mit N_{pH}/N_{perm} Versuchsbedingungen siehe Kapitel 7.2.6. - 7.2.13. Chlorid durch Sulfat ersetzt: 1 beids. (14/7), 2 lumens. (4/2), 3 bluts. (2/1), durch Gluconat ersetzt: 4 lumens. (29/16), 5 bluts. (19/9), 6 K⁺-frei (14/6), 7 Acetazolamid (6/3), Ouabain: 8 lumens. (13/7), 9 bluts. (13/6), Salicyls.: 10 1mM (3/3), 11 10mM (3/3), 12 PBA (10/6), 13 PABA 50mM lumens. (9/8), 14 Kontr. PABA 10 μ M (88/57). Regrgrd. (bis 100%): $-23,5+50,0 \cdot PABA_{NI}$, $r=0,985$, $N= 116$.

lyse nicht nachweisen. Eine von der Wirkung auf den Mechanismus der Ansäuerung eindeutig unabhängige inhibitorische Wirkung ließ sich, bis auf die Versuche mit PBA, mit keinem der eingesetzten Agenzien (Salicylsäure, Ouabain, Acetazolamid, SITS) oder Inkubationspuffer (Cl⁻-frei blutseitig, K⁺-frei) erzielen.

Eine lumenseitige chloridfreie Inkubation führt zu einer Stimulation der lumenseitigen Ansäuerung, der wiederum eine erhöhte Resorptionsrate des PARA folgt. In der Regressionsanalyse der relativen Permeationraten liegen diese Werte jedoch nicht auf der mit den inhibitorischen Versuchsbedingungen errechenbaren Regressionsgeraden; im Verhältnis zum Anteil der freien Säure am Versuchsende permeiert dabei zuwenig PARA (Abb.48). Dieser Befund könnte sich dabei aus dem Kurvenverlauf der Titration des Krebs-Tris-Glukose-Mannit-Puffers ergeben (Abb.1). Ab einem pH-Wert von 6,6 ist hier der Kurvenverlauf nicht mehr annähernd linear zur zugegebenen Säuremenge und der Puffer beginnt in den sauren Bereich abzukippen. Die dabei bewirkte, starke Änderung des pH-Wertes der Inkubationslösung in einem späten Stadium der Inkubation kann sich damit nicht mehr in eine adequate Steigerung der Gesamtpermeationsrate umsetzen.

In einem Teil der Versuche zur Permeation des PARA bei blutseitigem Angebot kam es ebenfalls zu einer Beeinflussung der Permeationsrate. Eine kaliumfreie Inkubation, blutseitig gegebenes PBA, Ouabain und 10 mM Salicylsäure führten dabei neben einer verminderten Alkalisierung des blutseitigen Inkubates auch zu einer deutlichen Steigerung des sekretorischen Flusses. Diese Steigerung folgt im Falle des Ouabains dabei nicht grundsätzlich den Änderungen der pH-Werte der blutseitigen Inkubationslösung. Obwohl lumen-seitig gegebenes Ouabain einen stärkeren Einfluß auf die Alkalisierung als der blutseitig gegebene Inhibitor hat, ist die Steigerung des sekretorischen Flusses im Falle der blutseitigen Gabe des Inhibitors größer. Bemerkenswert ist, daß eine blutseitig oder beidseitig chloridfreie Inkubation oder Acetazolamid, neben einer deutlichen Inhibition des Mechanismus der Alkalisierung der Blut-seite, sonst keine entsprechende stimulierende Wirkung auf die

Permeation von PABA nach blutseitigem Angebot zeigt. Die mit der durch eine lumenseitig chloridfreie Inkubation im Gluconat-Puffer verbundene Stimulation der blutseitigen Alkalisierung geht dagegen wiederum mit einer in diesem Fall verminderten Permeation von PABA einher.

Die Heterogenität des Einflusses der verschiedenen Versuchsbedingungen auf die Permeation des PABA in sekretorischer Richtung läßt den blutseitigen pH-Wert als einzige Erklärung dieser Befunde unwahrscheinlich werden. Ebenso sprechen die Versuche mit verschiedenen pH-Werten der Inkubationslösungen, in denen kein Einfluß des blutseitigen pH-Wertes auf die Sekretion des PABA sichtbar wird, gegen diese Vermutung.

Allen Versuchsbedingungen ist dagegen gemeinsam, daß in ihnen sehr viele der physiko-chemischen Grundparameter der Zelle wie, z.B., der intrazelluläre pH-Wert oder das Potential der Enterocyten, beeinflusst sein können. Den Versuchsbedingungen, die keinen Einfluß auf die Sekretionsrate genommen haben, ist dabei eine Inhibition des blutseitigen Anionenports und damit eine Alkalisierung des intrazellulären Raumes gemeinsam. Eine solche Alkalisierung des cytosolischen Raumes ohne einen Einfluß auf die Höhe des Membranpotentials konnte von Henderson und Mitarbeitern (1986) nach einer Gabe von Acetazolamid in vivo am Epithel der Ratten-Niere festgestellt werden. In isolierten Drüsenschläuchen der Magenschleimhaut führte bei Starlinger und Mitarbeitern (1987) eine Inkubation mit Gluconat zu einer Alkalisierung im intrazellulären Raum. An der Frosch-Haut führte eine blutseitige chloridfreie Inkubation zu einer Alkalisierung des intrazellulären Raumes auf den Wert des Inkubationsmediums (Duffey und Mitarbeiter, 1986).

Allen anderen Versuchsansätzen, mit Ausnahme der Versuche mit PBA, ist gemeinsam, daß in ihnen der Sekretionsmechanismus der sauren Äquivalente inhibiert wird. Die unterdrückte H^+ -Sekretion könnte zu einer Ansäuerung des intrazellulären Raumes und damit zu einer erhöhten Permeabilität des PABA über die lumenseitige Membran füh-

ren. Die Stimulation der Abgabe von PABA aus dem zellulären Raum bei einem Abfall des pH_i und die geringe Permeabilität der apikalen Membran bei einem Anstieg des pH_i belegen einmal mehr die Undurchlässigkeit dieser Membran für das PABA-Anion in der transepithelialen Permeation.

Ouabain wirkt bei blutseitiger Gabe über diese Einwirkung hinaus auch inhibierend auf die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase und nimmt damit Einfluß auf die intrazelluläre Potentialdifferenz. Eine Inhibition dieser in der contraluminalen Membran lokalisierten ATPase könnte auch eine Erklärung für die Wirkung von blutseitig gegebenem PBA bieten.

8.4.5 Contraluminaler Transport von PABA

Kann die Passage des PABA über die luminale Membran mit Mechanismen der non-ionic diffusion beschrieben werden, so bleibt doch die Frage nach der blutseitigen Elimination der, vor allem im Bereich höherer Angebotskonzentrationen, erheblichen Quantitäten an Tracer offen. Die Sättigung der Resorptionsquote ergibt sich aus dem Puffereffekt der Säure auf den Ansäuerungsmechanismus (Kap.8.3.9). Eine Sättigung des blutseitigen Abgabeschrittes, der zu einer Akkumulation von PABA im Gewebe führen sollte, konnte jedoch nicht beobachtet werden. Im Effluxexperiment wird der Tracer nach lumen- wie nach blutseitiger Vorbeladung überwiegend zur Blutseite abgegeben. Berechnet man hier die relativen Permeabilitäten beider Membranen anhand dieser Abgabe, so ist die contraluminalen Membran nach lumenseitiger Vorbeladung des Gewebes um den Faktor 3,8, nach blutseitiger Vorbeladung um den Faktor 6,8 permeabler als die luminale Membran. Die hohe Permeabilität von PABA in der contraluminalen Membran könnte auf einen vermittelten Transport der Säure in diesem Membransystem hindeuten.

Eine hohe Permeabilität der contraluminalen Membran ergibt sich auch aus den Experimenten zur Metabolisierung, in denen bei blutseitigem Angebot bei einer Angebotskonzentration von 20 μM

33,6 % der eingesetzten Menge an PABA den metabolisierenden, intrazellulären Raum erreichen konnte und als Ac-PABA wieder zur Blutseite abgegeben wurde. Vergleichbar zur Permeabilität des Ac-PABA werden am isolierten Meerschweinchen-Colon endogen gebildete Säuren wie die Milchsäure (Petersen, 1984), die Harnsäure (Sprakes, unveröffentlichte Ergebnisse), aber auch verschiedene phenolische Glukuronide (Sund und Lauterbach, 1985, Fries, 1986, Schorn, 1986) annähernd vollständig zur Blutseite abgegeben.

Liegen zum Transfermechanismus organischer Säuren in der lumen-seitigen Membran des Colons in der Literatur nur spärliche Informationen vor, so sind die Transfermechanismen über die blutseitige Membran überhaupt nicht untersucht worden. In der blutseitigen Membran des Nephrons sind dagegen verschiedene Carriermechanismen diskutiert worden (Übersicht bei Murer und Burckhardt, 1983). Nach Hagenbuch und Mitarbeitern (1985) wird dabei Bikarbonat am proximalen Ratten-Nephron über zwei verschiedene Carriersysteme im Antiport gegen Lactat oder gegen Sulfat ausgetauscht. Ullrich und Mitarbeiter unterscheiden in der contraluminalen Membran des proximalen Tubulus der Ratten-Niere drei verschiedene Transportsysteme anionischer Verbindungen mit teilweise überlappendender Substratspezifität: (1) ein System für Sulfat-Oxalat mit einer Inhibierbarkeit der Sulfat-Aufnahme durch eine Reihe von Sulfo-Verbindungen (1985a, 1985c), aber auch durch Formiat, Lactat, Pyruvat, Oxalat und PAH (1984) und verschiedenen Di- und Tricarbonsäuren (1985b); (2) ein natriumabhängiges Transportsystem für mittlere Dicarbonsäuren (C4-C8), welches auch Pyruvat transportiert (1984, 1986, 1987); (3) ein System für den Transport von PAH, Pyrazincarbonsäure und Nikotinsäure (1986) mit einer Inhibierbarkeit des PAH-Transportes durch mittel- bis langkettige Dicarbonsäuren (C6-C10) (1987). Milchsäure und Propionsäure sollen unabhängig von ihrer inhibitorischen Wirkung selbst nicht transportiert werden (1986). In der sinusoidalen Plasmamembran der Ratten-Leber wurde von Hugentobler und Meier (1986) ein elektroneutraler Antiport für Sulfat, Oxalat und Bernsteinsäure beschrieben. Chlorid, Bikarbonat, alle untersuchten Monocarbonsäuren wie die Essigsäure, Milch-

säure, Brenztraubensäure, PAH oder die Zitronensäure wurden nicht über diesen Carrier transportiert.

8.4.6 Untersuchungen zur unidirektionalen Aufnahme

Um die Permeabilität von PABA in der lumen- und blutseitigen Membran direkt bestimmen zu können, wurde im Rahmen dieser Untersuchung eine Methode zur Bestimmung des unidirektionalen Influx entwickelt. In Kurzzeitinkubationen wurde dabei die Aufnahme von PABA über die lumen- oder die blutseitige Membran untersucht. Der Influx von PABA in den Enterocyten ist in beiden Fällen nicht linear zur eingesetzten Konzentration. Die Kinetik dieser Aufnahmen läßt sich als Summe einer passiven Komponente und eines Anteils, der sich gemäß einer Michaelis-Menten Funktion verhält, beschreiben. Dabei sind die passiven Permeabilitäten zwischen apikaler und basolateraler Membran mit $5,3$ und $6,7 \cdot 10^{-4}$ cm/min in etwa gleich; die Differenz der Transferraten beider Membranen muß sich somit aus dem Carriersystem für PABA in der blutseitigen Membran ergeben. Der K_m -Wert dieses Systems mit $18,1$ mM und die maximale Transportrate von $55,3$ nmol pro cm^2 und min weist auf eine vergleichsweise hohe Transportkapazität hin. Für die lumenseitige Membran läßt sich ein K_m -Wert von $0,94$ mM und ein $v_{\max}$ von $1,6$ nmol pro cm^2 und min ermitteln.

Berechnet man auf der Grundlage der kinetischen Parameter die blutseitigen Aufnahmeraten für verschiedene Angebotskonzentrationen, so ergeben sich die größten Differenzen zu den experimentell bestimmten Werten im Bereich der kleinen Konzentrationen (Tab.43). Dieser Befund ergibt sich zum Teil aus der zur Kurvenanpassung verwendeten Methode der kleinsten Quadrate, bei der im Bereich höherer Konzentrationen schon eine kleine Abweichung eine relativ starke Veränderung in der Summe der Abweichungsquadrate ergibt. Auffallend ist jedoch auch, daß gerade bei den kleinen Konzentrationen die Aufnahmeraten von PABA in allen Fällen unterschätzt werden; dies könnte auf die Existenz einer sätti-

gungsfähigen dritten Aufnahme-Komponente neben dem passiven und vermittelten Transport hinweisen.

Sättigungsfähige Komponenten der Aufnahme müssen nicht zwingend aus einem Transport von Substrat über Membranen resultieren. So könnte die dritte Komponente bei dem blutseitigen Angebot einer extrazellulären Bindung von PABA an sättigungsfähigen Bindungsstellen in der contraluminalen Membran entsprechen. Darüberhinaus muß die Aufnahme in einen Raum der Mukosa ebenfalls nicht zwingend mit einem transepithelialen Transport verbunden sein. Dabei könnte die sättigungsfähige, lumenseitige Aufnahme dem Transport von PABA in ein lumenseitiges Metabolisierungs-kompartiment ohne Verbindung zur vaskulären Seite entsprechen.

8.4.7 Hemmung der blutseitigen Aufnahme von PABA

Eines der Merkmale vermittelter Transportvorgänge ist die Möglichkeit einer kompetitiven Inhibition durch analoge Verbindungen. Der blutseitige Transport von PABA kann über verschiedene organische Carbonsäuren gehemmt werden. Dabei ist die inhibitorische Wirkung nur in einem geringen Ausmaß von der chemischen Struktur der Säuren bestimmt; sowohl die in Analogie zum PABA eingesetzten aromatischen Säuren wie Ac-PABA, Benzoesäure, Salicylat und PAH wie auch die aliphatischen Carbonsäuren Essigsäure, Octansäure und Milchsäure inhibierten die Aufnahme von PABA. Gluconsäure hatte dagegen als einzige Carbonsäure keine inhibitorische Wirkung. Die Aufnahme von PABA konnte über das Glukuronid, jedoch nicht über das Sulfo-Konjugat des Nitrophenols gehemmt werden. Die Spezifität des Carriers für Carbonsäuren wurde mit einer Sulfonsäure und einer Base untersucht; das im gleichen Konzentrationsbereich wie die anderen Inhibitoren eingesetzte β -Naphtholorange und N-Methylscopolamin hemmen die Aufnahme von PABA nicht.

Aus der Inhibition der Aufnahme läßt sich, bei einer als kompetitiv angenommenen Wirkung des Inhibitors, für jede Verbindung eine Inhibitionskonstante (K_i) berechnen. Ein direktes Einsetzen der

experimentell ermittelten Aufnahmeraten in die entsprechenden Formeln war jedoch nicht möglich, da, wie bereits diskutiert, gerade im Bereich einer kleinen Angebotskonzentration von 10 μM die tatsächliche Aufnahme von PABA um 66,5 % unterschätzt wird. Um hier trotzdem zumindest zu einer Abschätzung der Inhibitionskonstanten zu kommen, sollen zwei Verfahren zur Korrektur der bei Inhibitorgabe ermittelten Aufnahmeraten diskutiert werden.

In beiden Verfahren errechnet sich nach Korrektur in den Kontrollen eine Aufnahmerate, die der theoretischen Aufnahme, errechnet mit den kinetischen Parametern, entspricht. Methode A geht dabei von einer Proportionalität zwischen errechnetem und tatsächlichem Wert aus. Die unter Einfluß des Inhibitors ermittelte Aufnahme wird dabei entsprechend um den hier ermittelten Prozentbetrag vermindert. Methode B geht von einem festen Betrag von extrazellulär am Gewebe gebundener Säure aus. Dieser Betrag wird als Differenz aus errechneter und tatsächlicher Aufnahme in der Kontrollbedingung gebildet und von den unter Einfluß des Inhibitors aufgenommenen Aufnahmeraten abgezogen. Im Vergleich führt Methode A zu einer Unterschätzung der K_i -Werte, da bei dieser Methode eine Bindung des Substrates als nicht inhibierbare Komponente der Aufnahme nicht berücksichtigt ist. Methode B überschätzt dagegen die K_i -Werte, da hier eine fehlende Wechselwirkung zwischen den Inhibitoren und den potentiellen Bindungsstellen angenommen wird.

Bei einem Vergleich beider Schätzungen erscheinen die mit Methode A ermittelten Werte realistischer (Tab.60). Für das Glukuronid konnte dabei in beiden Konzentrationen ein annähernd identischer K_i -Wert bestimmt werden. Der K_i -Wert vom Benzoat in Methode B spricht für eine Kompetition dieser Verbindung mit dem extrazellulär gebundenen Anteil der p-Aminobenzoesäure.

Abgesehen von diesen Differenzen, stimmen beide Auswertungsmethoden in der Tendenz überein. Danach kann man die Inhibitoren drei Gruppen zuordnen (Tab.60): Eine Gruppe, deren K_i -Wert deutlich geringer als der K_m von PABA ist (Salicyl- und Benzoessäure), eine Gruppe, deren K_i -Werte dem K_m von PABA in etwa gleich sind

(Milchsäure, PNP-Glukuronid, Ac-PABA) und eine Gruppe, deren K_i -Wert deutlich höher als der K_m von PABA ist (PAH, Essigsäure, Octansäure). Wenn die untersuchten Verbindungen selbst transportiert werden, so sollten sich die K_m -Werte der Aufnahme proportional zu ihren K_i -Werten verhalten. Dabei würde von den aromatischen Carbonsäuren Salicylat und Benzoat besser, Ac-PABA etwas schlechter und PAH nur in geringem Umfange transportiert. Von den aliphatischen Säuren würden nur das Lactat in etwa gleich, Acetat und Octanat dagegen schlechter als PABA transportiert. Das Glukuronid könnte in etwa gleichem Umfange wie PABA die contraluminal Membran über den Carrier permeieren.

Tab.60: Inhibitorkonstanten zur Aufnahme von 0,01 mM PABA über die contraluminal Membran. Kinetische Parameter $K_m=18,1$ mM, $v_{max}=55,3$ nmol/cm²min, errechnete Aufnahme 37,2 pmol/cm²min, Meth.A: eingesetztster Wert errechnet aus % Kontrolle und der errechneter Aufnahme, tatsächliche Aufnahme 62,0 pmol/cm²min, Meth.B: eingesetztster Wert entspricht der Differenz der Aufnahmeraten (s.a.Tab.43) und der Bindung; kalkulierte Bindungsrate: 24,8 pmol/cm²min

		Inhibitorkonstanten		
		Inhibition (% Kontrolle)	Meth. A (mM)	Meth. B (mM)
Salicylsäure	10 mM	54,8	8,14	1,74
Benzoessäure	30 mM	37,3	9,23	>=0
Milchsäure	30 mM	52,4	21,7	3,19
PNP-Glukuronid	10 mM	76,0	24,2	15,2
	30 mM	53,3	22,7	3,93
Ac-PABA	10 mM	78,9	28,9	19,9
PAH	30 mM	75,0	68,4	41,5
Essigsäure	30 mM	75,4	70,0	43,3
Octansäure	30 mM	83,0	114,7	92,1

Bei chloridfreier Inkubation konnte die Aufnahme von PABA unabhängig vom Ersatzanion -Gluconat oder Sulfat- gesteigert werden. In beiden Fällen war die Stimulation der Aufnahme gleich und damit ausschließlich auf das Fehlen des Chlorides beschränkt. Sulfat scheint damit, ähnlich der Sulfonsäure β -Naphtholorange, nicht

selbst mit dem Carrier zu interagieren. Damit erscheint eine Übereinstimmung des untersuchten Transportprinzips mit dem von Ullrich und Mitarbeitern (1984) beschriebenen Sulfat-Oxalat System in der contraluminalen Membran der Niere oder dem von Hugentobler und Meier (1986) beschriebenen Sulfat-Transporter in der sinusiodalen Membran der Leber als unwahrscheinlich. Eine Übereinstimmung mit dem PAH-Carrier oder dem Carrier der Dicarbonsäuren (Ullrich und Mitarbeiter, 1984, 1986, 1987) kann dagegen nicht ausgeschlossen werden. Daneben könnte der Einfluß der chloridfreien Inkubation auch auf eine direkte Beteiligung des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiports der contraluminalen Membran an der Permeation von PABA hindeuten. Daß dabei trotz der um Größenordnungen höheren Chlorid-Konzentration überhaupt PABA transportiert wird, sollte in diesem Fall auf eine vergleichsweise höhere Affinität der Carbonsäure zur Carrierstruktur hinweisen.

8.5. Permeation verschiedener Säuren im Vergleich zu PABA

8.5.1. β -Naphtholorange

Am Meerschweinchen-Colon permeiert die Sulfonsäure β -Naphtholorange (β -NO) bevorzugt in sekretorischer Richtung (Lauterbach, 1983). Die lumenseitige Ansäuerung und die blutseitige Alkalisierung wirken, wie die transepitheliale Potentialdifferenz von 11,7 mV, Lumenseite negativ (Schulze, unveröffentlichte Mitteilung), einer Netto-Sekretion von β -NO entgegen. Bei den im Rahmen dieser Studie durchgeführten Untersuchungen ist der Gewebsgehalt von β -Naphtholorange nach blutseitigem Angebot um den Faktor 8 höher als nach lumenseitigem Angebot. Die Permeation erfolgt in einem Verhältnis von 30 : 1 des sekretorischen Flusses zur resorptiven Flußrate. Gewebsgehalt wie Netto-Sekretion legen einen aktiven, blutseitigen Transport über eine Carrierstruktur nahe. Die Abgabe über die lumenseitige Membran könnte dagegen sowohl vermittelt wie auch über Mechanismen der passiven Diffusion erfolgen.

Nach blutseitiger Inkubation mit dem alkylierenden Agens Phenoxybenzamin (PBA) konnte die sekretorische Flußrate um mehr als 60 Prozent inhibiert werden. Parallel steigt jedoch auch der Gewebsgehalt um zwei Drittel seines Betrages an. Blutseitig gegebenes PBA wirkt damit einerseits inhibierend auf die Aufnahme des β -NO über die contraluminal Membran, beeinflusst jedoch noch stärker die Abgabe der Verbindung über die lumenseitige Membran. Eine Erklärung dieses Befundes könnte sich aus der Existenz verschiedener Räume in der Mukosa ergeben. Dabei könnte β -NO unter Einfluß des PBA in höherem Ausmaß in Strukturen, die nicht an der transepithelialen Permeation beteiligt sind, aufgenommen werden. Parallel könnte die Konzentration in anderen Räumen der Mukosa, die den Transport vermitteln, entsprechend der erniedrigten Permeationsrate verringert sein.

Ein anderes Modell der Erklärung dieses Befundes ist in Abb.49 dargestellt. Wie sich schon in den Versuchen mit PABA am Colon andeutet, könnte PBA auch die Na⁺/K⁺-ATPase inhibieren. Dies sollte eine Reduktion des intrazellulären Potentials (in Abb.49 auf die etwas unrealistischen 0 mV) bewirken. Wenn nun das intra-

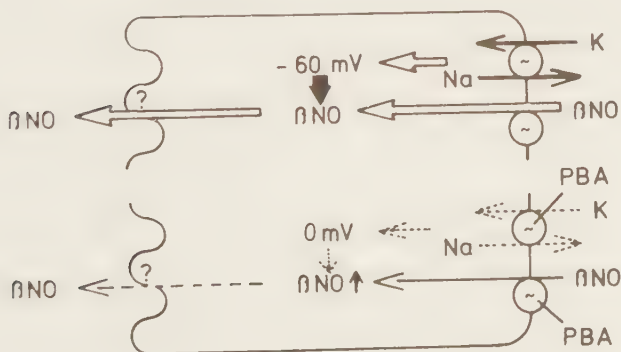


Abb.49: Modell der Wirkung von blutseitig gegebenem Phenoxybenzamin (PBA) auf den Transport von β -Naphtholorange; oben Kontrollbedingung, unten +PBA

zelluläre Potential als treibende Kraft eine wichtige Rolle bei der lumenseitigen Abgabe von β -NO spielt, könnte es unter Einfluß von PBA zu einer verminderten Abgabe und zu einer Akkumulation im Gewebe kommen. Für dieses Modellbild spricht auch der Befund, daß PABA im vergleichbaren Experiment unter Einfluß von blutseitig gegebenem PBA ebenfalls im Gewebe akkumuliert.

Mit der Sekretion des β -NO und der Resorption des PABA werden am Colon zwei Säuren mit unterschiedlicher Vorzugsrichtung transportiert. Die gleichzeitige Sekretion des β -NO und Resorption des PABA konnte in einer Versuchsserie mit einem Angebot der beiden Substrate in einer Inkubationslösung am gleichen Mukosapräparat demonstriert werden. Der 20fache Überschuß an PABA nahm keinen Einfluß auf den Transport von β -Naphtholorange. Umgekehrt kam es auch zu keiner Beeinflussung des Transportes von PABA. Die Aufnahme von PABA über die contraluminalen Membran konnte durch einen 1000fachen Überschuß von β -NO nicht beeinflußt werden. Damit deuten alle Befunde auf die Existenz zweier unterschiedlicher Transportmechanismen saurer Verbindungen im Meerschweinchen-Colon hin.

8.5.2. Salicylsäure

Neben PABA wird auch Ac-PABA und die Salicylsäure bevorzugt in resorptiver Richtung transportiert. Die Netto-Resorption des Salicylates steht im Gegensatz zu Untersuchungen von Lauterbach und Steinke (1981, Lauterbach, 1983), in denen gleiche Transportraten dieser Verbindung nach lumen- wie blutseitigem Angebot beschrieben werden. Der in dieser Untersuchung eingesetzte Krebs-Hepes Puffer hat jedoch, im Gegensatz zum Tris-Medium, eine wesentlich höhere Pufferkapazität, so daß es zu keiner ausgeprägten Ansäuerung des lumenseitigen Mediums kommt. In Vergleichsexperimenten, in denen ebenfalls ein Krebs-Hepes Puffer eingesetzt wurde, war die Netto-Resorption der Salicylsäure weniger stark ausgeprägt als im Tris-Medium. Untersuchungen zum Metabolismus der Salicylsäure wurden im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt. Nach Untersuchungen von Steinke (1980) kann am Meerschweinchen-Jejunum

ein Metabolit des Salicylates nur im Mukosaextrakt, nicht jedoch in den Inkubationslösungen nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Resorption von Salicylat ergibt sich ein besonders auffälliger Befund aus dem konstanten Verhältnis von Gewebsgehalt und Permeationsrate. Das Verhältnis aus der intrazellulären Konzentration und der Konzentration im blutseitigen Inkubat beträgt bei 0,01 mM 3,45, bei 0,1 mM 3,18, bei 2 mM 2,93 und bei 20 mM 2,82. Damit kommt es bei steigender Konzentration des Angebotes zu keiner Anreicherung der Säure im Gewebe. Die Abgabe und damit die Resorptionsquote ist direkt mit der lumenseitigen Aufnahme korreliert. Die fehlende Substratsättigung spricht für eine hohe Transportkapazität des Ausschleusungsmechanismus.

Bei blutseitigem Angebot des Substrates kann weder eine Sättigung der Gewebsgehalte noch der Permeationsraten im Bereich hoher Angebotskonzentrationen beobachtet werden. Salicylsäure ist darüber-

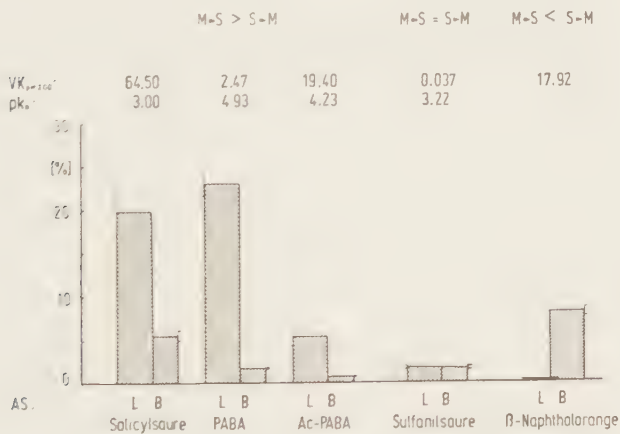


Abb.50: Permeationsraten von 10 μ M lumen- (L) oder blutseitig (B) gegebener Salicylsäure, PABA, Ac-PABA, Sulfanilsäure und β -Naphtholorange im Vergleich zu den Verteilungskoeffizienten (isoButanol/ Citrat-Lsg. pH2,00) und den pK_a-Werten

hinaus, wie an anderer Stelle ausführlicher diskutiert wurde (vgl. 8.3.2.2), ein potenter Inhibitor der Aufnahme von PABA. Zusammenfassend legen damit alle Befunde einen blutseitig vermittelten Transport dieser Säure nahe.

Salicylsäure ist mit einem pK_a von 3 eine stärkere Säure als PABA, weist jedoch eine vergleichbare Permeationsrate in der resorptiven Richtung auf (Abb.50). Aus dem pH-Wert der lumenseitigen Inkubationslösung von 6,53 und dem pK errechnet sich ein Anteil an freier Säure von 0,03 % (PABA: 2,45 %). Die Permeabilität dieser freien Säure muß also bei einer Resorption über Mechanismen der non-ionic diffusion dem Vielfachen der Permeabilität des PABA entsprechen. Ein Hinweis auf die Permeabilität ergibt sich aus dem Verteilungskoeffizienten (VK) zwischen einer organischen und einer wässrigen Phase. Um dabei den Verteilungskoeffizienten der freien Säure zu bestimmen, wurde in der wässrigen Phase eine Citrat-Lösung mit einem pH-Wert von 2, in der organischen Phase iso-Butanol eingesetzt. In Übereinstimmung mit der Permeation erweist sich dabei Salicylsäure mit einem VK von 64,5 gegenüber PABA mit 2,47 als die eindeutig lipophilere Substanz. Die in dieser Studie experimentell ermittelten VK-Werte stehen in guter Übereinstimmung zu in der Literatur beschriebenen Verteilungskoeffizienten (Octanol/ Wasser) von 173,8 für Salicylat und 5,5 für PABA (Laznick und Mitarbeiter, 1987).

8.5.3. Ac-PABA

Ac-PABA wird, wie PABA, bevorzugt in der resorptiven Richtung transportiert. Unabhängig von der Seite des Angebotes sind dabei die Transferraten wie auch der Gewebsgehalt am Versuchsende deutlich geringer als beim PABA. Eine Deacetylierung oder andere metabolische Umsetzung von Ac-PABA konnte in der isolierten Meerschweinchen-Mukosa nicht beobachtet werden.

Ac-PABA ist mit einem pK_a von 4,23 eine stärkere Säure als PABA. Bei einem pH-Wert der lumenseitigen Inkubationslösung von 6,53 am

Versuchsende ergibt sich damit ein Anteil an freier Säure von 0,50 % (PABA 2,45 %). Im Vergleich dazu beträgt die Permeationsrate bei lumenseitigem Angebot von 0,01 mM Substrat für PABA 23,02 % und für Ac-PABA 5,33 %. Im Gegensatz zu der überwiegend transzellulären Resorption des Ac-PABA ist die im größeren Anteil parazelluläre Sekretionsrate im Verhältnis zum PABA weniger stark eingeschränkt. Die im gleichen Verhältnis wie der Anteil der freien Säure verminderte Resorptionsquote spricht damit für ähnliche Permeabilitäten der freien Säure. Im Widerspruch hierzu weist allerdings der, unter den gleichen Bedingungen wie für die Salicylsäure aufgenommene, Verteilungskoeffizient Ac-PABA mit 19,4 als deutlich lipophilere Substanz als PABA aus (Abb.50). Dieser Befund deckt sich jedoch nicht mit den R_f -Werten der Dünnschichtchromatographie. Nach der zurückgelegten Strecke ist hier Ac-PABA gegenüber PABA die polarere Substanz.

8.5.4. Sulfanilsäure

Der pK_s der Sulfanilsäure ist mit 3,22 ähnlich dem der Salicylsäure. Im Gegensatz zu dieser Verbindung erfolgt die Permeation jedoch ausschließlich extrazellulär. Entsprechend der für beide Angebotsseiten gleichen PEG-Permeation kann damit für die Sulfanilsäure kein Netto-Transport beobachtet werden (Abb.50). In Übereinstimmung mit der fehlenden transzellulären Permeation wird Sulfanilsäure nur in Spuren in das Gewebe aufgenommen. Die geringe Permeation wie auch der Gewebsgehalt sprechen für eine geringe Permeabilität der freien Form der Säure. Dies bestätigt sich auch im Verteilungskoeffizienten, der wie bei der Salicylsäure bestimmt wurde. Mit einem VK von 0,037 weist sich dabei die Sulfanilsäure als äußerst polare Substanz aus; im Vergleich zur Salicylsäure entspricht dabei dieser VK einer um den Faktor 1700 höheren Verteilung in die wässrige Phase.

9. Schlußbetrachtungen

In der vorliegenden Untersuchung sollte versucht werden, einen Beitrag zum besseren Verständnis der Permeation von Carbonsäuren am Darm zu liefern. Als Modellsubstrat wurde dabei die schwache Säure p-Aminobenzoesäure gewählt. Aus bisherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe war bekannt, daß die Sulfonsäure β -Naphtholorange, vergleichbar zu verschiedenen Herzglykosiden, sowohl am Jejunum als auch am Colon einer Netto-Sekretion unterliegt. Um so überraschender war bei der p-Aminobenzoesäure der Befund einer Netto-Sekretion am Jejunum und einer Netto-Resorption am Colon, womit zum ersten Mal eine unterschiedliche Vorzugsrichtung des Netto-Transportes für das gleiche Substrat in den beiden Darmabschnitten belegt werden konnte. Die Funktion von mindestens zwei verschiedenen Transportmechanismen organischer Säuren am Colon kann über die unterschiedliche Vorzugsrichtung des Transportes von β -Naphtholorange und PABA hinaus auch in der fehlenden Wechselwirkung beider Substrate bei einem gemeinsamen Angebot bestätigt werden. Ein ebenfalls unterschiedlicher Transportmechanismus der beiden Verbindungen am Jejunum erschließt sich aus dem Einfluß von Phenoxybenzamin auf die Sekretionsrate.

Als besonders glücklicher Umstand erwies sich bei den Untersuchungen zur Permeation von PABA die Konjugations-Reaktion der Acetylierung, in der PABA in der Mukosa zu N-Acetyl-PABA umgesetzt wird. Über diese nur intrazellulär ablaufende Reaktion war es möglich, den transzellulären Weg des PABA über die Verteilung des Metaboliten zu verfolgen. Aus dem Verteilungsmuster des Metaboliten kann der Befund einer Kompartimentierung des Jejunums in einen nur lumen- und einen nur blutseitig erreichbaren Metabolisierungsraum jetzt auch auf die Acetylierung ausgedehnt werden. Darüber hinaus kann -im Gegensatz zu allen bisher untersuchten Metabolisierungsreaktionen- eine Kompartimentierung der Metabolisierung auch im Colon nachgewiesen werden.

Der Befund verschiedener metabolisierender Räume ist nicht auf das Meerschweinchen beschränkt; auch am humanen Darmpräparat läßt sich eine ähnliche Verteilung des Metaboliten Ac-PABA nachweisen. Geht man von vergleichbaren Permeabilitäten in den Membransystemen bei der Spezies aus, so könnten die beim Meerschweinchen postulierten Carriersysteme, die den Transport von PABA in die Metabolisierungsräume vermitteln, auch beim Menschen realisiert sein. Der Kompartimentierung der Metabolisierung im Darm des Menschen kommt eine besondere Bedeutung in der Kinetik oral applizierter Pharmaka zu. Mit der isolierten Mukosa des Meerschweinchen-Darmes steht dabei ein leicht zugängliches Modell zur Untersuchung dieses Mechanismus zur Verfügung.

Eine befriedigende Analyse des Permeationsmechanismus am Jejunum ist ohne ein Verständnis der in den Metabolisierungsstudien aufgedeckten Kompartimentierung nicht möglich. An der Permeation eines Substrates können potentiell die insgesamt vier Membransysteme der beiden Metabolisierungsräume beteiligt sein. Dabei scheint nur der Transport von PABA und Ac-PABA über die Membranen der Angebotsseiten der metabolisierenden Kompartimente carriervermittelt zu sein, während die Permeation in den zur jeweiligen Gegenseite weisenden Membransystemen dagegen über Mechanismen der non-ionic diffusion erfolgen könnte. Als Vermittler des sekretorischen Flusses kann das lumenseitige Kompartiment diskutiert werden, wobei sich der acidere pH-Wert im Bereich der basolateralen Membran als treibende Kraft der Netto-Sekretion anbietet. Damit ergibt sich aus diesem Modellbild auch eine Erklärung der durch die unterschiedlichen pK_a -Werte verschiedenen Permeabilitäten von PABA und Ac-PABA im Aufnahmeschritt wie auch der vergleichbaren Permeabilität im carriervermittelten Abgabeschritt. Die Netto-Sekretion von PABA wäre damit beim Meerschweinchen an die Sekretion von Bikarbonat zur Lumen- und von sauren Äquivalenten zur Blutseite gebunden. Am humanen Präparat konnte dagegen, in Übereinstimmung mit dem hier sauren Mikroklima im Bereich der apikalen Membran, eine Netto-Resorption der Säure beobachtet werden.

Eine Kompartimentierung der metabolisierenden Reaktion am Meer-schweinchen-Jejunum ist nicht an den sauren Charakter der Metabo-lite gebunden, sondern läßt sich auch für das Aminoacetophenon und das Herzglykosid Cymarol nachweisen. Damit gewinnen die beiden me-tabolisierenden Räume der Mukosa auch in den Untersuchungen zur Permeation nicht saurer Substrate an Bedeutung; eine unter Einbe-ziehung dieser Befunde durchgeführte Analyse könnte dabei zu einer kritischen Neubewertung der bisher diskutierten Modellbilder des Transportes führen.

Der lumenseitige Metabolisierungsraum des Colons ist an der trans-epithelialen Permeation der Säure nicht beteiligt. Der eigentliche resorptive Fluß wird, ähnlich der Sekretion am Jejunum, im Auf-nahmeschritt in das Transportkompartiment über Mechanismen der non-ionic diffusion vermittelt. Die hohe Resorptionsquote ergibt sich dabei aus einer Ansäuerung des lumenseiten Inkubates über eine aktive Sekretion von Wasserstoffionen. Die Säuresekretion und der Einfluß des Inhibitors Acetazolamid weisen auch auf eine mög-liche Erklärung der bisher kontrovers diskutierten Fragestellung nach der physiologischen Aufgabe der hohen Carboanhydrase-Aktivi-tät im Meerschweinchen-Colon hin; wie in der Magen-Mukosa könnte dabei diesem Enzym die Funktion der Bereitstellung eines Teiles der im Sekretionsmechanismus benötigten Protonen zufallen.

Von besonderer physiologischer Bedeutung ist auch der in der blut-seitigen Membran lokalisierte Carriermechanismus anionischer Ver-bindungen, der die Elimination von PABA und Ac-PABA aus dem Trans-portkompartiment zur Blutseite vermittelt. In basolateralen Mem-branen konnten Transportsysteme organischer Säuren bisher in der Leber und in der Niere beschrieben werden. Mit dem Transporter für PABA wird dieser Befund jetzt auch auf das Colon ausgedehnt. Dar-überhinaus ergibt sich damit auch für die bisher nur quantitativ beschriebene, bevorzugte Ausschleusung von endogen gebildeten Säu-ren wie den Glukuroniden, der Milchsäure und der Harnsäure zur Blutseite eine befriedigende Erklärung. Anders als an anderen Or-gansystemen findet sich dabei kein Hinweis, der auf eine Wechsel-

wirkung zwischen diesem Transporter und den Transportmechanismen von β -Naphtholorange, Sulfat oder den Sulfokonjugaten deutet.

Eine mögliche Interpretation der physiologischen Bedeutung der zwischen der herbivoren Spezies Meerschweinchen und der omnivoren Spezies Mensch aufgefundenen Unterschiede in der Permeation schwacher organischer Säuren könnte sich aus den Ernährungsgewohnheiten beider Arten ergeben. Beim Meerschweinchen wird im Jejunum das Darmlumen über eine Sekretion von Bikarbonat alkalisiert. Vogel und Mitarbeiter (1970) diskutieren als Grundlage dieser Sekretion die Rolle des Bikarbonates als Leition einer Wasserenterosorption, durch die der Nahrungsbrei verstärkt aufgeschwemmt wird. Allgemein findet sich bei den herbivoren Arten ein größerer Anteil der Körperflüssigkeit im Magen-Darm Trakt als bei den omnivoren Arten; so beträgt z.B. der Anteil der Flüssigkeit im Intestinaltrakt beim Meerschweinchen 10-20 % des Körperwassers gegenüber nur 3-7 % bei der Ratte (Cizek, 1956). Dieses Milieu begünstigt nun den bakteriellen Abbau der Nahrungscellulose im Caecum und im Colon. Die ernährungsphysiologisch wichtigste Gruppe der dabei entstehenden Verbindungen wird von den kurzkettigen Fettsäuren gebildet (Hoverstadt und Mitarbeiter, 1985). Hier paßt sich der aufgefundene Mechanismus einer lumenseitigen Ansäuerung im Colon sehr gut ein. Mit der Enterosorption von Flüssigkeit im Jejunum und einer Ansäuerung im Colon in Verbindung mit der blutseitig carriervermittelten Abgabe steht damit dem Meerschweinchen ein sehr effizient an seine Ernährungsgewohnheiten angepaßter Mechanismus zur Auswertung stark cellulosehaltiger Nahrung zur Verfügung. Über die pharmakologisch interessante Fragestellung zum Säuretransport am Darm hinaus konnte damit in der vorliegenden Studie auch ein Beitrag zum Verständnis der Ernährungsphysiologie nicht-wiederkäuender Herbivoren gewonnen werden.

10. Literaturverzeichnis

- Agarwal, N., Haggerty, J.G., Adelberg, E.A., Slayman, C.W., 1986
Isolation and characterization of a Na-H antiporter-deficient
mutant of LLC-PK₁ cells
Am.J.Physiol., 251, C825-C830
- Ahn, J., Chang, E.B., Field, M., 1985
Phorbol ester inhibition of Na-H exchange in rabbit proximal colon
Am.J.Physiol., 249, C527-C530
- Argenzio, R.A., Southworth, M., 1974
Sites of organic acid production and absorption in gastro-
intestinal tract of the pig
Am.J.Physiol., 228, 454-460
- Argenzio, R.A., Southworth, M., Lowe, J.E., Stevens, C.E., 1977
Interrelationship of Na, HCO₃, and volatile fatty acid transport
by the equine large intestine
Am.J.Physiol., 233, E469-E478
- Arvanitakis, C., Longnecker, M.P., Folscroft, J., 1978
Characterization of p-aminobenzoic acid transport across the rat
intestine
J.Lab.Clin.Med., 91, 467-472
- Barry, P.H., Diamond, J.M., 1984
Effects of unstirred layers on membrane phenomena
Physiol.Rev., 64, 763-872
- Benos, D.J., 1982
Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and
cells
Am.J.Physiol., 242, C131-C145
- Bernhard, K., 1940
Z.Physiol.Ch., 267, 91-99
zit. nach Bray und Mitarbeiter, 1948
- Bihler, I., Crane, R.K., 1962
Studies on the mechanism of intestinal absorption of sugars
V. The influence of several cations and anions on the active
transport of sugars, in vitro, by various preparations of hamster
small intestine
Biochim.Biophys.Acta, 59, 94
- Binder, H.J., Rawlins, C.L., 1973
Electrolyte transport across isolated large intestinal mucosa
Am.J.Physiol., 225, 1232-1239

- Binder, H.J., Murer, H., 1986
Potassium / proton exchange in brush-border membrane of rat ileum
J.Membr.Biol., 91, 77-84
- Blair, J.A., Johnson, I.T., Matty, A.J., 1974
Absorption of folic acid by everted segments of rat jejunum
J.Physiol., 236, 653-661
- Blair, J.A., Lucas, M.L., Matty, A.J., 1975
Acidification in the rat proximal jejunum.
J.Physiol., 245, 333-350
- Blair, J.A., Lucas, M.L., Swanston-Flatt, S.K., 1981
Intestinal folic acid absorption and the acid microclimate. The effects of compounds relevant to folate malabsorption
Pflügers Arch., 392, 29-33
- Blondheim, S.H., Kunkel, H.G., 1950
Portal blood in collateral veins of patients with cirrhosis
Acetylation by the intestine
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 73, 38-41
- Bondesen, S., Nielsen, O.H., Schou, J.B., Jensen, P.H., Lassen, L.B., Binder, V., Krasilnikoff, P.A., Dano, P., Hansen, S.H., Rasmussen, S.N., Hvidberg, E.F., 1986
Steady-state kinetics of 5-aminosalicylic acid and sulfapyridine during sulfasalazine prophylaxis in ulcerative colitis
Scand.J.Gastroenterol., 21, 693-700
- Bonventre, J.V., Cheung, J.Y., 1985
Effects of metabolic acidosis on viability of cells exposed to anoxia
Am.J.Physiol., 249, C149-C159
- Bosund, I., 1957
The effect of salicylic acid, benzoic acid and some of their derivatives on oxidative phosphorylation
Acta Chem.Scand., 11, 541-544
- Bown, R.L., Gibson, J.A., Sladen, G.E., Hicks, B., Dawson, A.M., 1974
Effects of lactulose and other laxatives on ileal and colonic pH as measured by a radiotelemetry device
Gut, 15, 999-1004
- Bratton, A.C., Marshall, E.K.jr., 1939
A new coupling component for sulfanilamide determination
J.Biol.Chem., 128, 537-550
- Bray, H.G., Lake, H.J., Neale, F.C., Thorpe, W.V., Wood, P.B., 1948
The fate of certain organic acids and amides in the rabbit.
4. The aminobenzoic acids and their amides
Biochem.J., 42, 434-443

- Bray, G.A., 1960
A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter
Analyt.Biochem., 1, 279-285
- Brisolla-Diuana, A., Amorena, C., Malnic, G., 1985
Transfer of base across the basolateral membrane of cortical tubules of rat kidney
Pflügers Arch., 405, 209-215
- Brody, T.M., 1956
Action of sodium salicylate and related compounds on tissue metabolism in vitro
J.Pharmacol.Exp.Ther., 117, 39-51
- Bruze, M., Fregert, S., 1983
Studies on purity and stability of photopatch test substances
Contact Dermatitis, 9, 33-39
- Burckhardt, B.-C., Frömter, E., 1980
Bicarbonate transport across the peritubular membrane of rat kidney proximal tubule
in: Hydrogen transport in epithelia, S.277-285 eds.: Schulz, I., Sachs, G., Forte, J.G., Ullrich, K.J., Elsevier/North Holland, Amsterdam - Oxford - New York
- Cabantchik, Z.I., Rothstein, A., 1972
The nature of the membrane sites controlling anion permeability of human red blood cells as determined by studies with disulfonic stilbene derivatives
J.Membr.Biol., 10, 311-330
- McCabe, R., Cooke, H.J., Sullivan, L.P., 1982
Potassium transport by rabbit descending colon
Am.J.Physiol., 242, C81-C86
- McCabe, R.D., Smith, P.L., Sullivan, L.P., 1984
Ion transport by rabbit descending colon: mechanisms of transepithelial potassium transport
Am.J.Physiol., 246, G594-G602
- Carter, M.J., Parsons, D.S., 1970
The purification and properties of carbonic anhydrases from guinea-pig erythrocytes and mucosae of the gastrointestinal tract
Biochem.J., 120, 797-808
- Carter, M.J., Parsons, D.S., 1973
Action of carbonic anhydrase inhibitors in the gastrointestinal tract
in: Pharmacology of gastrointestinal motility and secretion, S. 613-638, eds.: Holton, P., Pergamon Press, Oxford - New York - Toronto - Sydney - Braunschweig

- Cassano, G., Stieger, B., Murer, H., 1984
Na/H- and Cl/OH-exchange in rat jejunal and rat proximal tubular brush border membrane vesicles
Pflügers Arch., 400, 309-317
- Chalfin, D., Cooperstein, I.L., Hogben, C.A.M., 1958
Fluid and electrolyte movement across intestinal wall of bullfrog
Proc.Soc.Exp.Biol., 99, 746-748
- Cizek, L.J., 1956
Total water content of laboratory animals with special reference to volume of fluid within the lumen of the gastrointestinal tract
Am.J.Physiol., 179, 104
- Cummings, J.H., 1981
Short-chain fatty acids in the human colon
Gut, 22, 763-779
- Daniel, H., Neugebauer, B., Kratz, A., Reehner, G., 1985
Localization of acid microclimate along intestinal villi of rat jejunum.
Am.J.Physiol., 248, G293-G298
- Davenport, H.W., 1965a
Damage to the gastric mucosa: Effects of salicylate and stimulation
Gastroenterology, 49, 189-196
- Davenport, H.W., 1965b
Potassium fluxes across the resting and stimulated gastric mucosa: Injury by salicylate and acetic acids
Gastroenterology, 49, 238-245
- Davenport, H.W., 1966
Fluid produced by the gastric mucosa during damage by acetic and salicylic acids
Gastroenterology, 50, 487-499
- Davenport, H.W., 1969
Gastric mucosal hemorrhage in dogs: Effects of acid, aspirin and alcohol
Gastroenterology, 56, 439-449
- Dawson, J.R., Bridges, J.W., 1981
Guinea-pig intestinal sulphotransferases: an investigation using the cytosol fraction
Biochem.Pharmacol., 30, 2409-2413
- Duffey, M.E., Kelepouris, E., Peterson-Yantorno, K., Civan, M.M., 1986
Microelectrode study of intracellular pH in frog skin: dependence on serosal chloride
Am.J.Physiol., 251, F468-F474

- Elander, B., Fellenius, E., Leth, R., Olbe, L., Wallmark, B., 1986
Inhibitory action of omeprazole on acid formation in gastric glands and on H^+ , K^+ -ATPase isolated from human gastric mucosa
Scand.J.Gastroenterol., 21, 268-272
- Ellinger, A., Hensel, M., 1914
Z.physiol.Chem., 91, 21
zit.nach Zehender, 1943
- von Engelhardt, W., Rechkemmer, G., 1983
Absorption of inorganic ions and short-chain fatty acids in the colon of mammals
in: Intestinal Transport, S.26-45, eds.:Gilles-Baillien, M., Gilles, R., Springer Verlag, Berlin - Heidelberg
- Evans, D.A.P., White, T.A., 1964
Human acetylator polymorphism
J.Lab.Clin.Med., 63, 394-403
- Feldman, G.M., Arnold, M.A., Charney, A.N., 1984
On the mechanism of luminal CO_2 generation during jejunal bicarbonate absorption
Am.J.Physiol., 246, G687-G694
- Fellenius, E., Berglinth, T., Sachs, G., Olbe, L., Elander, B., Sjöstrand, S.E., Wallmark, B., 1981
Substituted benzimidazoles inhibit acid secretion by blocking the H^+ , K^+ -ATPase
Nature, 290, 159-161
- Fischer, E., Lauterbach, F., 1984
Effect of hyperglycaemia on sugar transport in the isolated mucosa of guinea-pig small intestine
J.Physiol., 355, 567-586
- Foster, E.S., Dudeja, P.K., Brasitus, T.A., 1986
 Na^+ - H^+ exchange in rat colonic brush-border membrane vesicles
Am.J.Physiol., 250, G781-G787
- Foster, E.S., Hayslett, J.P., Binder, H.J., 1984
Mechanism of active potassium absorption and secretion in the rat colon
Am.J.Physiol., 246, G611-G617
- Fries, A., 1986
Enteraler Metabolismus und Metabolitenverteilung von p-Nitrophenol
Diplomarbeit, Bochum
- Gacia, J.A., Campos, M.S., Lopez, M.A., 1984
Bicarbonate secretion in the rabbit colon. Its relationship with sodium, potassium, and chloride movements
Molecular Physiol., 5, 159-164

- Gardner, M.L.G., Mitchell, C.J., 1981
Studies on the absorption of the pancreatic function test peptide, N-Benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid, and related compounds by isolated rat small intestine
Quart.J.Exp.Physiol., 66, 17-24
- Gardner, L.G., Burston, D., Plumb, J.A., 1984
Quality control and the structural integrity of intestinal preparations used for the study of absorption in vitro
Vortrag, Abstracts of the 6th meeting of the European Intestinal Transport Group, Pamplona, Spain, 27-29 Sept.84
- Gharbo, S.A., Boyer, J.A., Williamson, M.J., 1985
Colorimetric plasma assay for the bentiromide test (BT-PABA) for exocrine pancreatic insufficiency
Analyt.Biochem., 148, 228-232
- Giese, M., 1983
Vergleichende Untersuchung zur Permeation von Thioharnstoff, Phenobarbital und Hydrocortison an der isolierten Mukosa verschiedener Abschnitte des Meerschweinchendarms
Diplomarbeit, Bochum
- Gillio-Tos, M., Previtera, S.A., Vimercati, A., 1964
Separation of some aromatic amines by thin-layer chromatography
J.Chromatogr., 13, 571-572
- Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S., Singh, R.M.M., 1966
Hydrogen ion buffers for biological research
Biochemistry, 5, 467-477
- Gottschalk, G., Kaiser, R.E., 1972
Elementare Tests zur Beurteilung von Meßdaten
BI Hochschultaschenbuch Nr.774
Bibliographisches Institut Mannheim, Mannheim
- Gram, E., 1971
Enzymatic N-, O-, and S-dealkylation of foreign compounds by hepatic microsomes
in: Concepts in Biochemical Pharmacology, Teil 2, Handbuch der experimentellen Pharmakologie Band 28, S. 334-348, eds.: Brodie, B.B., Gillette, J.R., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
- Grinpukel, S., Sewell, R., Yeomans, N., Mihaly, G., Smallwood, R., 1986
Lack of effect of omeprazole, a potent inhibitor of gastric (H^+ , K^+)-ATPase, on hepatic lysosomal integrity and enzyme activity
J.Pharm.Pharmacol., 38, 158-160
- Grinstein, S., Rothstein, A., 1986
Mechanisms of regulation of the Na^+/H^+ exchanger
J.Membr.Biol., 90, 1-12

- Grinstein, S., Turner, R.J., Silverman, M., Rothstein, A., 1980
Inorganic anion transport in kidney and intestinal brush border
and basolateral membranes
Am.J.Physiol., 238, F452-F460
- Gunther, R.D., Wright, E.M., 1983
Na⁺, Li⁺, and Cl⁻ transport by brush border membranes from rabbit
jejunum
J.Membr.Biol., 74, 85-94
- Gustin, M.C., Goodman, D.B.P., 1981
Isolation of brush-border membrane from the rabbit descending
colon epithelium
J.Biol.Chem., 256, 10651-10656
- Gustin, M.C., Goodman, D.B.P., 1982
Characterization of the phosphorylated intermediate of the
K⁺-ouabain-insensitive ATPase of the rabbit colon brush-border
membrane
J.Biol.Chem., 257, 9629-9633
- Hagen, P., Robinson, K.W., 1953
The production and absorption of volatile fatty acids in the
intestine of the guinea-pig
Austral.J.Exp.Biol., 31, 99-104
- Hagenbuch, B., Stange, G., Murer, H., 1985
Transport of sulphate in rat jejunal and rat proximal tubular
basolateral membrane vesicles
Pflügers Arch., 405, 202-208
- Halm, D.R., Dawson, D.C., 1984
Potassium transport by turtle colon: active secretion and active
absorption
Am.J.Physiol., 246, C315-C322
- Hartiala, K.J.W., Terho, T., 1965
Metabolic acetylation by the mucosal membrane of the gastro-
intestinal tract.
Nature, 205, 809-810
- Hatch, M., Freel, R.W., Goldner, A.M., Earnest, D.L., 1984
Oxalate and chloride absorption by the rabbit colon: sensitivity
to metabolic and anion transport inhibitors
Gut, 25, 232-237
- Hearse, D.J., Weber, W.W., 1973
Multiple N-acetyltransferases and drug metabolism.
Tissue distribution, characterization and significance of
mammalian N-acetyltransferase
Biochem.J., 132, 519-526

- Hein, D.W., Smolen, T.N., Fox, R.R., Weber, W.W., 1982
Identification of genetically homocygous rapid and slow
acetylators of drugs and environmental carcinogens among
established inbred rabbit strains
J.Pharmacol.Exp.Ther., 223, 40-44
- Hein, D.H., Kirilin, W.G., Ferguson, R.J., Weber, W.W., 1985
Biochemical investigation of the basis for the genetic
N-acetylation polymorphism in the inbred hamster
J.Pharmacol.Exp.Ther., 234, 358-364
- Henderson, R.M., Bell, P.B., Cohen, R.D., Browning, C., Iles,
R.A., 1986
Measurement of intracellular pH with microelectrodes in rat kidney
in vivo
Am.J.Physiol., 250, F203-F209
- Hildmann, B., Storelli, C., Haase, W., Barac-Nieto, M., Murer, H.,
1980
Sodium ion / L-Lactate co-transport in rabbit small-intestinal
brush-border-membrane vesicles
Biochem.J., 186, 169-176
- Höfer, M., 1977
Transport durch biologische Membranen
Das Konzept der Trägerkatalyse
Verlag Chemie, Weinheim - New York
- Hogben, C.A.M., 1952
Gastric anion exchange: its relation to the immediate mechanism of
hydrochloric acid secretion
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 38, 13-18
- Hogben, C.A.M., Tocco, D.J., Brodie, B.B., Schanker, L.S., 1959
On the mechanism of intestinal absorption of drugs
J.Pharmacol.(Exp.Ther.), 125, 275-282
- Högerle, M.L., Winne, D., 1983
Drug absorption by the rat jejunum perfused in situ. Dissociation
from the pH-partition theory and role of microclimate-pH and
unstirred layer
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol., 322, 249-255
- Hoverstad, T., 1986
Studies of short-chain fatty acid absorption in man
Scand.J.Gastroenterol., 21, 257-260
- Hoverstad, T., Midtvedt, T., Bohmer, T., 1985
Short-chain fatty acids in intestinal content of germfree mice
monocontaminated with Escherichia coli or Clostridium difficile
Scand.J.Gastroenterol., 20, 373-380

- Hugentobler, G., Meier, P.J., 1986
Multispecific anion exchange in basolateral (sinusoidal) rat liver plasma membrane vesicles
Am.J.Physiol., 251, G656-G664
- Irjala, K., 1972
Synthesis of p-aminohippuric, hippuric, and salicyluric acids in experimental animals and man
Ann.Acad.Sci.Fenn. (Series A), 154, 5-40
- Israili, Z.H., Dayton, P.G., 1984
Enhancement of xenobiotic elimination: Role of intestinal excretion
Drug Met.Rev., 15, 1123-1159
- Johanson, C.E., Parandoosh, Z., Smith, Q.R., 1985
Cl-HCO₃ exchange in choroid plexus: analysis by the DMO method for cell pH
Am.J.Physiol., 249, F478-F484
- Jørgensen, T.G., Weis-Fogh, U.S., Nielsen, H.H., Olesen, H.P., 1976
Salicylate- and aspirin-induced uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from the mucosal membrane of the stomach
Scand.J.Clin.Lab.Invest., 36, 649-654
- Kaunitz, J.D., 1986
Isolation and characterization of a potassium-dependent proton pump from rabbit colon
Gastroenterology, 90, 1486
- Kersten, R., 1982
Sekretion von Pharmaka an der isolierten Mukosa des menschlichen Darms
Diplomarbeit, Bochum
- Kilian, U., Lauterbach, F., 1978
Intestinal secretion of xenobiotics
Gastroenterol.Clin.Biol., 2, 323
- Kitis, G., Lucas, M.L., Schneider, R.E., Bishop, H., Sargent, A., Blair, J.A., Allan, R.V., 1979
Jejunal acid microclimate, and its effect on absorption of folic acid and propranolol.
Gut, 20, A438
- Knickelbein, R., Aronson, P.S., Atherton, W., Dobbins, J.W., 1983
Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. I. Evidence for Na-H exchange
Am.J.Physiol., 245, G504-G510

- Knickelbein, R., Aronson, P.S., Schron, C.M., Seifter, J., Dobbins, J.W., 1985
Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border.
II. Evidence for Cl-HCO_3 exchange and mechanism of coupling
Am.J.Physiol., 249, G236-G245
- Koivusalo, M., Luukkainen, T., Miettinen, T., Pispä, J., 1958
Effect of benzoic acid on the metabolic conjugations of p-amino-benzoic acid in the rat
Acta Chem.Scand., 12, 1919
- Koivusalo, M., Luukkainen, T., Miettinen, T., Pispä, J., 1959
Urinary metabolites of p-aminobenzoic acid in man.
Ann.Med.Exp.Biol.Fenn., 37, 93-99
- Kolassa, N., Krivanek, P., Turnheim, K., 1977
Weak electrolyte transfer in the guinea pig jejunum: Secretion of trimethoxybenzoic acid
Naunyn-Schmiedeberg's *Arch.Pharmacol.*, 298, 223-228
- Koster, A.S., Frankhuijzen-Sierevogel, A.C., Noordhoek, J., 1985
Distribution of glucuronidation capacity (1-naphthol and morphine) along the rat intestine
Biochem.Pharmacol., 34, 3527-3532
- Lamers, J.M.J., Hülsmann, W.C., 1975
Inhibition of pyruvate transport by fatty acids in isolated cells from rat small intestine
Biochim.Biophys.Acta, 394, 31-45
- Lang, F., Messner, G., Rehwald, W., 1986
Electrophysiology of sodium-coupled transport in proximal renal tubules
Am.J.Physiol., 250, F953-F962
- Langridge-Smith, J.E., Field, M., 1981
Sulfate transport in rabbit ileum: characterization of the serosal border anion exchange process
J.Membr.Biol., 63, 207-214
- Langman, R.C., Stremsterfer, C.E., Schanker, L.S., 1971
Absorption of organic anions from the rat small intestine
Xenobiotica, 1, 613-619
- Lauterbach, F., 1971
Untersuchungen über den Mechanismus der Permeation cardiotoner Steroide durch die Mukosa des Dünndarmes - ein Beitrag zur Theorie der Resorption von Pharmaka
Habilitationsschrift
Bochum / Essen

- Lauterbach, F., 1975
Resorption und Sekretion von Arzneistoffen durch die Mukosaepithelien des Gastrointestinaltraktes
Arzneim.Forsch./Drug Res., 25, 479-488
- Lauterbach, F., 1976
Fluxes of ions and drugs in isolated guinea-pig intestinal mucosa.
J.Physiol., 266, 27P-28P
- Lauterbach, F., 1977
Passive permeabilities of luminal and basolateral membranes in the isolated mucosal epithelium of guinea pig small intestine
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol., 297, 201-212
- Lauterbach, F., 1983
Intestinal secretion of organic ions
in: Intestinal Transport, S.76-86, eds.: Gilles-Baillien, M., Gilles, R., Springer Verlag, Berlin - Heidelberg
- Lauterbach, F., 1984
Intestinal permeation of organic bases and quaternary ammonium compounds
in: Pharmacology of intestinal permeation Band II, Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Band 70/II, S.271-299, eds.: Csaky, T.Z., Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York - Tokyo
- Lauterbach, F., Kilian, U., 1976
Intestinal secretion of p-(2-hydroxy-1-naphthylazo)benzenesulfonic acid (β -naphthol-orange) *in vivo* and *in vitro*
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol., 293, R45
- Lauterbach, F., Steinke, W., 1981
Comparative aspects of the intestinal secretion of organic acids and its inhibition by probenecid and phenoxylbenzamine
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol., 316, R50
- Laznicek, M., Kvetina, J., Mazak, J., Krch, V., 1987
Plasma protein binding-lipophilicity relationships: interspecies comparison of some organic acids
J.Pharm.Pharmacol., 39, 79-83
- Lazzell, C.L., Johnston, J., 1928
Solubility relations of isomeric organic compounds
VIII. Solubility of the aminobenzoic acids in various liquids
J.Phys.Chem., 32, 1331-1341
- Lönnérholm, G., 1977
Carbonic anhydrase in the intestinal tract of the guinea-pig
Acta Physiol.Scand., 99, 53-61
- Lönnérholm, G., Selking, Ö., Wistrand, P.J., 1985
Amount and distribution of carbonic anhydrases CAI and CAII in the gastrointestinal tract
Gastroenterology, 88, 1151-1161

- Lucas, M.L., 1976
The association between acidification and electrogenic events in the rat proximal jejunum
J.Physiol., 257, 645-662
- Lucas, M.L., 1983
Determination of acid surface pH in vivo in rat proximal jejunum
Gut, 24, 734-739
- Lucas, M.L., Cooper, B.T., Lei, F.H., Johnson, I.T., Holmes, G.K.T., Blair, J.A., Cooke, W.T., 1978
Acid microclimate in coeliac and Crohn's disease: a model for folate malabsorption.
Gut, 19, 735-742
- Lucas, M.L., Lei, F.H., Blair, J.A., 1980
The influence of buffer pH, glucose and sodium ion concentration on the acid microclimate in rat proximal jejunum in vitro
Pflügers Arch., 385, 137-142
- Madara, J.L., 1983
Increases in guinea pig small intestinal transepithelial resistance induced by osmotic loads are accompanied by rapid alterations in absorptive-cell tight-junction structure
J.Cell Biol., 97, 125-136
- Munck, B.G., 1976
The role of the paracellular route in water transport by rat jejunum in vitro
in: *Intestinal ion transport*, S.41-43, eds.: Robinson, J.W.L., Lancaster MTP press Ltd., Lancaster
- Murer, H., Burckhardt, G., 1983
Membrane transport of anions across epithelia of mammalian small intestine and kidney proximal tubule
Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol., 96, 2-51
- Murer, H., Hopfer, U., Kinne, R., 1976
Sodium / proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney
Biochem.J., 154, 597-604
- Naupert, Ch., Rommel, K., 1975
Absorption of short and medium chain fatty acids in the jejunum of the rat.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem., 13, 553-562
- McNeil, N.I., Cummings, J.H., James, W.P.T., 1978
Short chain fatty acid absorption by the human large intestine
Gut, 19, 819-822

Noack, S., 1980

Statistische Auswertung von Meß- und Versuchsdaten mit
Taschenrechner und Tischcomputer
Walter de Gruyter, Berlin - New York

Nord, E.P., Hafezi, A., Kaunitz, J.D., Trizna, W., Fine, L.G.,
1985

pH gradient-dependent increased Na^+ - H^+ antiport capacity of the
rabbit remnant kidney
Am.J.Physiol., 249, F90-F98

Pacifici, G.M., Bencini, C., Rane, A., 1986

Acetyltransferase in humans: Development and tissue distribution
Pharmacology, 32, 283-291

Parsons, D.S., 1956

The absorption of bicarbonate-saline solutions by the small
intestine and colon of the white rat.
Quart.J.Exp.Physiol., 41, 410-420

Parsons, D.S., 1968

Methods for investigation of intestinal absorption
in: Handbook of Physiology, Section 6: Alimentary Canal, Vol.III:
Intestinal Absorption, S.1177-1216, eds.: Heidel, W., American
Physiological Society, Washington D.C.

Peppas, N.A., Hansen, P.J., Buri, P.A., 1984

A theory of molecular diffusion in the intestinal mucus
Int.J.Pharm., 20, 107-118

Perrin, D.D., 1965

Dissociation constants of organic bases
Butterworths, London

Petersen, D., 1984

Die Sekretion von Digoxin und β -Naphtholorange an der isolierten
Mukosa des Rattencolons
Dissertationsschrift
Bochum / Dortmund

Phillips, S.F., Schmalz, P.F., 1970

Bicarbonate secretion by the rat colon: Effect of intraluminal
chloride and acetazolamide
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 135, 116-122

Rechkemmer, G., 1981

Resorption und Sekretion von Elektrolyten und kurzkettigen
Fettsäuren im proximalen und distalen Colon des Meerschweinchens
und die Bedeutung des wandnahen Mikroklimas
Dissertationsschrift
Universität Hohenheim

Rechkenmer, G., Wahl, M., Kuschinsky, W., v.Engelhardt, W., 1986
pH-Mikroclimate at the luminal surface of the intestinal mucosa of
guinea pig and rat
Pflügers Arch., 407, 33-40

Rehm, W.S., Sanders, S.S., 1975
Implications of the neutral carrier $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -exchange mechanism
in the gastric mucosa
Ann.N.Y.Acad.Sci., 246, 442-455

Remesy, C., Demigne, C., 1976
Partition and absorption of volatile fatty acids in the alimentary
canal of the rat
Ann.Rech.Veter., 7, 39-55

Richards, R.K., 1942
Fed.Proc., 1, 71
zit.nach The Merck Index, 10th ed., 1983
Merck & Co.Inc., Rayway N.J. USA

Riddle, B., Jencks, W.P., 1971
Acetyl-coenzyme A: arylamine N-acetyltransferase
Role of the acetyl-enzyme intermediate and the effects of
substituents on the rate
J.Biol.Chem., 246, 3250-3258

Riese, B., 1987
Vergleichende Untersuchungen der enteralen Resorption cardiotoner
Steroide an verschiedenen Abschnitten des Darmes
Diplomarbeit, Bochum

Riggs, T.R., Christensen, H.N., 1951
Metabolic conjugations of p-aminobenzoic acid in the rat
J.Biol.Chem., 193, 675-681

Roediger, W.E.W., Deakin, E.J., Radcliffe, B.C., Nance, S., 1986
Anion control of sodium absorption in the colon
Quart.J.Exp.Physiol., 71, 195-204

Roggin, G-M., Banwell, J.G., Yardley, J.H., Hendrix, T.R., 1972
Unimpaired response of rabbit jejunum to cholera toxin after
selective damage to villus epithelium
Gastroenterology, 63, 981-989

Roos, A., Boron, W.F., 1981
Intracellular pH
Physiol.Rev., 61, 296-434

Roos, H., Pfleger, K., 1972
Kinetics of adenosine uptake by erythrocytes, and the influence of
dipyridamole
Mol.Pharmacol., 8, 417-425

- Rosenberg, I.H., 1981
 Intestinal absorption of folate
 in: Physiology of the gastrointestinal tract, S.1221-1230, eds.:
 Johnson, L.R., Raven Press, New York
- Rubinov, S.I., 1975
 Introduction to mathematical biology
 Verlag John Wiley & sons, New York - London - Sydney - Toronto
- Rubinstein, R., Howard, A.V., Wrong, O.M., 1969
 In-vivo dialysis of faeces as a method of stool analysis
 IV. The organic anion component
 Clin.Sci., 37, 549-564
- Rübsamen, K., v. Engelhardt, W., 1981
 Absorption of Na, H ions and short chain fatty acids from the
 sheep colon
 Pflügers Arch., 391, 141-146
- Rummel, W., Seifen, E., 1964
 Narkose, Injektion und Blutentnahme bei Versuchstieren
 in: Biochemisches Taschenbuch, zweiter Teil, Kapitel 7/VI,
 S.324-330, zweite Auflage, eds.: Rauen, H.M., Springer Verlag,
 Berlin-Göttingen -Heidelberg
- Ruppin, H., Bar-Meir, S., Soergel, K.H., Wood, C.M., Schmitt,
 M.G.jr, 1980
 Absorption of short-chain fatty acids by the colon
 Gastroenterology, 78, 1500-1507
- Russel, R.M., Dhar, G.J., Dutta, S.K., Rosenberg, I.H., 1979
 Influence of intraluminal pH on folate absorption: studies in
 control subjects and in patients with pancreatic insufficiency
 J.Lab.Clin.Med., 93, 428-436
- Sachs, L., 1974
 Angewandte Statistik
 Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York
- Said, H.M., Strum, W.B., 1983
 A pH-dependent, carrier-mediated system for transport of 5-methyl-
 tetrahydrofolate in rat jejunum
 J.Pharmacol.Exp.Ther., 226, 95-99
- Sasaki, S., Shiigai, T., Takeuchi, J., 1985
 Intracellular pH in the isolated perfused rabbit proximal straight
 tubule
 Am.J.Physiol., 249, F417-F423
- Schanker, L.S., 1959
 Absorption of drugs from the rat colon
 J.Pharmacol.(Exp.Ther.), 126, 283-290

Schanker, L.S., Tocco, D.J., Brodie, B.B., Hogben, C.A.M., 1958
Absorption of drugs from the rat small intestine
J.Pharmacol.(Exp.Ther.), 123, 81-88

Schorn, M., 1986
Kompartimentierung der Metabolitenbildung und Metabolitenabgabe
von 17 β -Oestradiol an der isolierten Mukosa des Jejunums und
Colons von Meerschweinchen und Mensch
Diplomarbeit, Bochum

Schultz, S.G., 1981
Ion transport by mammalian large intestine
in: Physiology of the Gastrointestinal tract, S.991-1002, eds.:
Johnson, L.R., Raven Press, New York

Scott, C.C., Robbins, E.B., 1942
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 49, 184
zit.nach The Merck Index, 10th ed., 1983
Merck & Co.Inc., Rayway N.J. USA

Selhub, J., Powell, G.M., Rosenberg, I.H., 1984
Intestinal transport of 5-methyltetrahydrofolate
Am.J.Physiol., 246, G515-G520

Sellin, J.H., de Soignie, R., 1984
Rabbit proximal colon: a distinct transport epithelium
Am.J.Physiol., 246, G603-G610

Sherwin, C.P., 1924
Acetylation as a physiologic reaction
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 22, 182

Shiau, Y.-F., Fernandez, P., Jackson, M.J., Mc Monagle, S., 1985
Mechanisms maintaining a low-pH microclimate in the intestine
Am.J.Physiol., 248, G608-G617

Shore, P.A., Brodie, B.B., Hogben, C.A.M., 1957
The gastric secretion of drugs: a pH partition hypothesis
J.Pharmacol.(Exp.Ther.), 119, 361-369

Smith, G.W., Tasman-Jones, C., Wiggins, P.M., Lee, S.P., 1985
Pig gastric mucus: A one-way barrier for H⁺
Gastroenterology, 89, 1313-1318

Smith, P.L., McCabe, R.D., 1984
Mechanism and regulation of transcellular potassium transport by
the colon
Am.J.Physiol., 247, G445-G456

Smith, P.L., Cascairo, M.A., Sullivan, S.K., 1985
Sodium dependence of luminal alkalization by rabbit ileal mucosa
Am.J.Physiol., 249, G358-G368

- Smith, P.L., Sullivan, S.K., McCabe, R.D., 1986
Concentration-dependent effects of disulfonic stilbenes on colonic chloride transport
Am.J.Physiol., 250, G44-G49
- Smyth, D.H., Taylor, C.B., 1958
Intestinal transfer of short-chain fatty acids in vitro.
J.Physiol., 141, 73-80
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G., 1967
Statistical methods
Iowa state university press, Iowa USA
- Spencer, R.P., Brody, K.R., Vishno, F., 1966
Species differences in the intestinal transport of p-aminobenzoic acid
Comp.Biochem.Physiol., 17, 883-889
- Sprakties, G., 1983
In vitro-Untersuchungen zur enteralen Harnsäureausscheidung
Diplomarbeit, Bochum
- Starlinger, M., Paradiso, A.M., Machen, T.E., 1987
Steady state regulation of intracellular pH in isolated gastric glands. Roles for Na/H and Cl/OH (HCO_3) exchange
Gastroenterology, 92, 957-965
- Steinke, W., 1980
Über den Mechanismus der enteralen Permeation von β -Lactam Antibiotika
Diplomarbeit, Bochum
- Stevens, C.E., Argenzio, R.A., Clemens, E.T., 1980
Microbial digestion: Rumen versus large intestine
in: Digestive physiology and metabolism in ruminants, S.685-706,
eds.: Ruckebusch, Y., Thivend, P., MTP Press, Lancaster
- Storelli, C., Corcelli, A., Cassano, G., Hildmann, B., Murer, H., Lippe, C., 1980
Polar distribution of sodium-dependent and sodium-independent transport system for L-lactate in the plasma membrane of rat enterocytes
Pflügers Arch., 388, 11-16
- Sullivan, S.K., Smith, P.L., 1986
Bicarbonate secretion by rabbit proximal colon
Am.J.Physiol., 251, G436-G445
- Sund, R.B., Lauterbach, F., 1978
Intestinal secretion of sulfanilic acid by the isolated mucosa of guinea pig jejunum
Acta Pharmacol.Toxicol., 43, 331-338

- Sund, R.B., Lauterbach, F., 1985
Drug metabolism and metabolite transport in the small and large intestine: experiments with 1-naphthol and phenolphthalein by luminal and contraluminal administration in the isolated guinea pig mucosa
Acta Pharmacol.Toxicol., 57, 1-10
- Sundqvist, T., Magnusson, K.-E., 1985
Modelling of intestinal permeability in man to polyethylene glycols (PEG 400 and PEG 1000)
Acta Physiol.Scand., 125, 289-296
- Suzuki, Y., 1984
H⁺ secretion in the guinea pig colonic mucosa
in: *Secretion: mechanisms and control*, S.71-75, eds.: Case, Lingard, Young, Manchester University Press, Manchester U.K.
- Thompkins, L., Lee, K.H., 1969
Studies on the mechanism of action of salicylates
IV: Effect of salicylates on oxidative phosphorylation
J.Pharm.Sci., 58, 102-105
- Thomson, A.B.R., Dietschy, J.M., 1984
The role of unstirred water layer in intestinal permeation
In: *Pharmacology of Intestinal Permeation II*, Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Band 70/II, S.165-270, eds.: Csaky, T.Z., Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York - Tokyo
- Turnberg, L.A., Bieberdorf, F.A., Morawski, S.G., Fordtran, J.S., 1970
Interrelationships of chloride, bicarbonate, sodium, and hydrogen transport in the human ileum
J.Clin.Invest., 49, 557-567
- Turnheim, K., Lauterbach, F.O., 1977a
Absorption and secretion of monoquaternary ammonium compounds by the isolated intestinal mucosa
Biochem.Pharmacol., 26, 99-108
- Turnheim, K., Lauterbach, F., 1977b
Secretion of monoquaternary ammonium compounds by guinea pig small intestine in vivo
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol., 299, 201-205
- Turnheim, K., Lauterbach, F., 1980
Interaction between intestinal absorption and secretion of monoquaternary ammonium compounds in guinea pigs - A concept for the absorption kinetics of organic cations
J.Pharmacol.Exp.Ther., 212, 418-424
- Turnheim, K., Lauterbach, F., Kolassa, N., 1977
Intestinal transfer of the quaternary ammonium compound N-methyl-scopolamine by two transport mechanisms in series
Biochem.Pharmacol., 26, 763-767

- Ullrich, K.J., Papavassiliou, F., 1986
 Contraluminal transport of small aliphatic carboxylates in the proximal tubule of the rat kidney in situ
 Pflügers Arch., 407, 488-492
- Ullrich, K.J., Rumrich, G., Klöss, S., 1980
 Active sulfate reabsorption in the proximal convolution of the rat kidney: specificity, Na^+ and HCO_3^- -dependence
 Pflügers Arch., 383, 159-163
- Ullrich, K.J., Fasold, H., Rumrich, G., Klöss, S., 1984
 Secretion and contraluminal uptake of dicarboxylic acids in the proximal convolution of rat kidney
 Pflügers Arch., 400, 241-249
- Ullrich, K.J., Rumrich, G., Klöss, S., 1984
 Contraluminal sulfate transport in the proximal tubule of the rat kidney
 I. Kinetics, effects of K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , H^+ , and anions
 Pflügers Arch., 402, 264-271
- Ullrich, K.J., Rumrich, G., Klöss, S., 1985a
 Contraluminal sulfate transport in the proximal tubule of the rat kidney
 II. Specificity: sulfate-ester, sulfonates and amino sulfonates
 Pflügers Arch., 404, 293-299
- Ullrich, K.J., Rumrich, G., Klöss, S., 1985b
 Contraluminal sulfate transport in the proximal tubule of the rat kidney
 III. Specificity: disulfonates, di- and tri-carboxylates and sulfo-carboxylates
 Pflügers Arch., 404, 300-306
- Ullrich, K.J., Rumrich, G., Klöss, S., Lang, H.-J., 1985c
 Contraluminal sulfate transport in the proximal tubule of the rat kidney
 V. Specificity: phenolphthaleins, sulfonphthaleins, and other sulfo dyes, sulfamoyl-compounds and diphenylamine-2-carboxylates
 Pflügers Arch., 404, 311-318
- Ullrich, K.J., Rumrich, G., Fritzsche, G., Klöss, S., 1987
 Contraluminal para-aminohippurate (PAH) transport in the proximal tubule of the rat kidney
 II. Specificity: Aliphatic dicarboxylic acids
 Pflügers Arch., 408, 38-45
- Vogel, G., Passmann, H., Meyering, E., 1970
 Besonderheiten der Sorption im Intestinaltrakt des Meerschweinchens. Bicarbonat-"Sekretion" und Flüssigkeitsenterosorption längs des gesamten Dünndarmes
 Pflügers Arch., 321, 259-273

- Wagner, J.D., Kurtin, P., Charney, A.N., 1985
Effect of systemic acid-base disorders on colonic intracellular pH and ion transport
Am.J.Physiol., 249, G39-G47
- Walter, A., Hastings, D., Gutknecht, J., 1982
Weak acid permeability through lipid bilayer membranes. Role of chemical reactions in the unstirred layer
J.Gen.Physiol., 79, 917-933
- Weber, W.W., 1971
Acetylating, deacetylating and amino acid conjugating enzymes in: Concepts in Biochemical Pharmacology, Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd.28/2, S. 564-583, eds.: Brodie, B.B., Gillette, J.R., Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York
- Weber, W.W., Hein, D.W., 1985
N-acetylation pharmacogenetics
Pharmacol.Rev., 37, 25-79
- Weber, W.W., Cohen, S.N., 1967
N-Acetylation of drugs: isolation and properties of an N-acetyltransferase from rabbit liver
Mol.Pharmacol., 3, 266-273
- Weber, W.W., Radtke, H.E., Tannen, R.H., 1980
Extrahepatic N-Acetyltransferases and N-Deacetylases in: Extrahepatic Metabolism of Drugs and Other Foreign Compounds, S.493-531, eds.: Gram, T., MTP Press Limited, Manchester UK
- Weiser, M.M., 1973
Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis
J.Biol.Chem., 248, 2536-2541
- White, J.F., 1985
Omeprazole inhibits H⁺ secretion by *Amphiuma jejunum*
Am.J.Physiol., 248, G256-G259
- Wilson, T.H., Wiseman, G., 1954
The use of sacs of inverted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface
J.Physiol., 123, 116-125
- Winne, D., 1977
Shift of pH-absorption curves
J.Pharmacokin.Biopharm., 5, 53-94
- Wollenberg, P., Ullrich, V., Rummel, W., 1983
Conjugation of 1-naphthol and transport of 1-naphthol-conjugates in the vascularly perfused small intestine of the mouse
Biochem.Pharmacol., 32, 2103-2107

- Yamato, C., Kinoshita, K., 1978
Hydrolysis and metabolism of N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid in normal and pancreatic duct-ligated animals
J.Pharmacol.Exp.Ther., 206, 468-474
- Yasuhara, M., Kobayashi, H., Muranishi, S., Sezaki, H., Kimura, T., 1978
Absorption and metabolism of p-aminobenzoic acid by rat intestine in vitro
J.Pharm.Dyn., 1, 114-121
- Yasuhara, M., Kobayashi, H., Kurosaki, Y., Kimura, T., Muranishi, S., Sezaki, H., 1979a
Comparative studies on the absorption mechanism of p-aminobenzoic acid and p-acetamidobenzoic acid from the rat intestine
J.Pharm.Dyn., 2, 177-186
- Yasuhara, M., Yoshino, T., Kimura, T., Muranishi, S., Sezaki, H., 1979b
Effect of surfactants on the absorption of p-aminobenzoic acid from the rat intestine
J.Pharm.Dyn., 2, 251-256
- Yasuhara, M., Kimura, T., Sezaki, H., 1983
Transport characteristics of p-acetamidobenzoic acid in brush border membrane of rat small intestine
J.Pharm.Dyn., 6, 888-891
- Yasuhara, M., Kurosaki, Y., Kimura, T., Sezaki, H., 1984
Drug elimination function of rat small intestine: metabolism and intraluminal excretion
Biochem.Pharmacol., 33, 3131-3136
- Zehender, F., 1943
Über die Acetylierung von primären aromatischen Aminen in vivo und in vitro.
Helv.Chim.Acta, 26, 1338-1352



An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für die freundliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

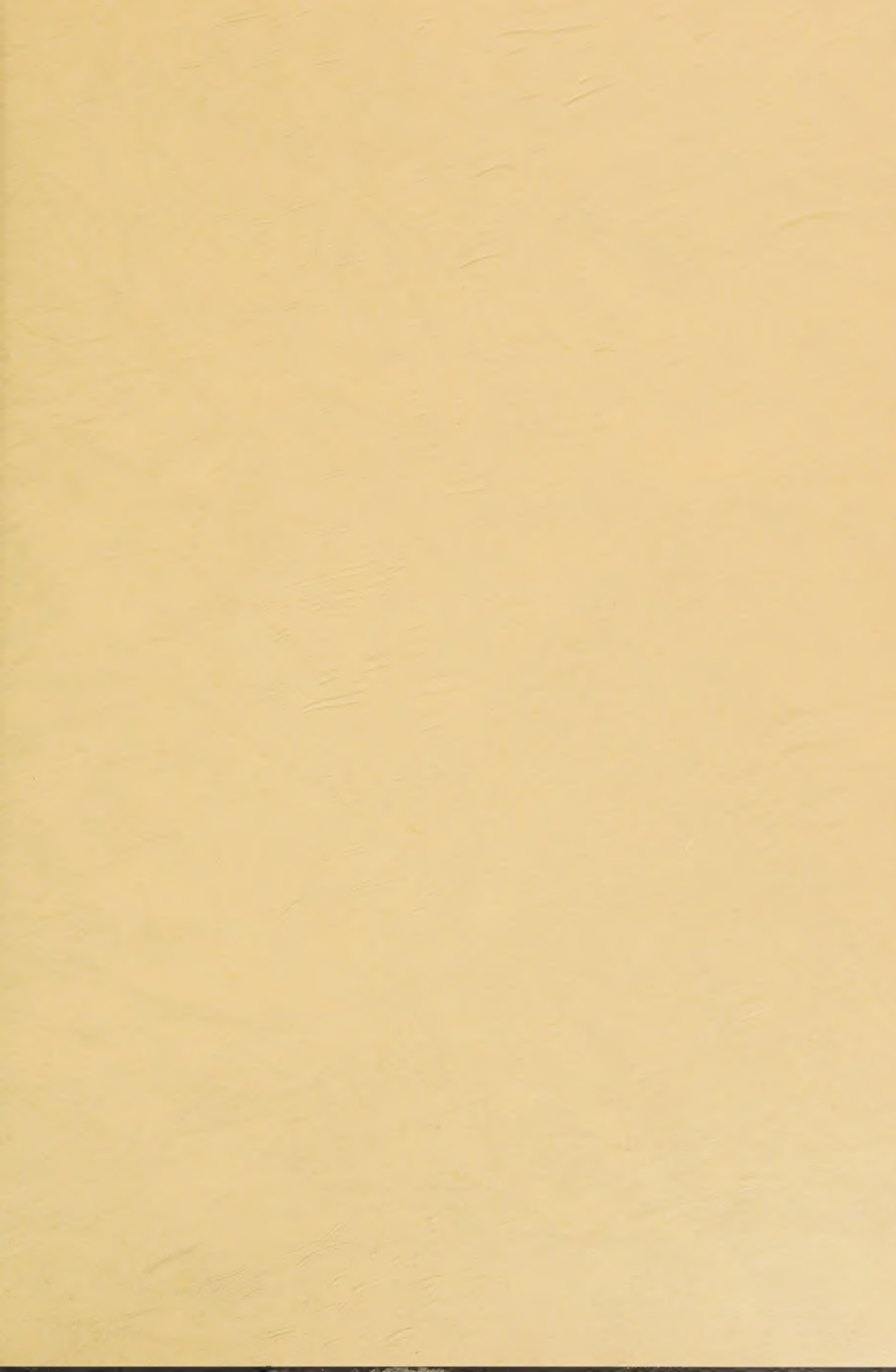
Insbesondere gilt dabei mein Dank Herrn Prof. Dr. F. Lauterbach für den Vorschlag des Themas und die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeit im Labor der Arbeitsgruppe, für die stets freundliche Anteilnahme wie auch für die intensive und anregende Diskussion.

Frau Erika Mannheim möchte ich für die brillante technische Assistenz bei der Durchführung der Experimente danken, ohne die einige Versuchsansätze sicher nicht durchführbar gewesen wären. Bei Frau Sabine Becker und Frau Ursula Krabbe möchte ich mich für die jederzeit gewährte praktische Unterstützung bedanken.

Herrn Dr.Klaus Orth, Herrn Michael Schorn und Herrn Ralf-Peter Czekay danke ich für die wertvollen Denkanstöße und Anregungen bei der Abfassung der Arbeit.

Lebenslauf

- 29.08.1957 geboren in Gelsenkirchen als Sohn der Eheleute Heinz und Gertrud Sprakties, geb. Eckberg
- Ostern 1964 - Besuch der katholischen Johannis-Volksschule, Gelsenkirchen
26.07.1967
- 7.09.1967 - Besuch der Lessing Realschule, Gelsenkirchen, mit Abschluß
28.05.1973 der mittleren Reife
- 1.08.1973 - Besuch der differenzierten gymnasialen Oberstufe der Gesamt-
16.06.1976 schule Berger Feld, Gelsenkirchen, mit Abschluß der allgemeinen Hochschulreife
- 12.10.1976 Aufnahme des Studiums an der Ruhr-Universität Bochum im
Fach Biologie, mit dem Studienziel Diplom
- 27.03.1979 Diplom-Vorprüfung im Fach Biologie
- 13.06.1983 Diplom-Hauptprüfung im Fach Biologie, Gesamtnote zwei;
Titel der Arbeit: In vitro-Untersuchungen zur enteralen Harn-
säureausscheidung
- 15.06.1983 - Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für
15.06.1986 Pharmakologie und Toxikologie der Ruhr-Universität Bochum,
Arbeitsgruppe Biochemische Pharmakologie unter Herrn Prof.
Dr. Fritz Lauterbach
- 27.03.1986 Eheschließung mit Frau Dr.rer.nat. Ursula Braun
- 1.07.1986 - Abschlußstipendium zur Promotion nach dem Gesetz zur Förderung
31.12.1986 des wissenschaftlichen und künstlerischen Nachwuchses des Landes
Nordrhein-Westfalen (Graduiertenförderungsgesetz NW)



FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606